Transport und Phosphorylierung von Zuckern und Zuckeralkoholen bei Streptococcus mutans

von

Karlheinz Stegmeier

aus

Weißenburg

1973

1974 № 2

Transport und Phosphorylierung von Zuckern und Zuckeralkoholen bei Streptococcus mutans

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von

Karlheinz Stegmeier
aus
Weißenburg

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 11. 1973

Dekan: Professor Dr. J. Christiansen
Erstberichterstatter: Professor Dr. H. J. Bestmann
Zweitberichterstatter: Professor Dr. H. Kersten

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Meinem geschätzten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. J. Bestmann, danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und Herrn Professor Dr. A. Kröncke für das stete Interesse und die Förderung, die er diesen Untersuchungen entgegenbrachte.

Herrn Priv.Doz. Dr. F. Gehring von der Universitäts-Kieferklinik Würzburg gilt mein Dank für die Überlassung der Bakterienstämme und für die serologische und biochemische Überprüfung der von mir erzeugten Mutanten.

Die Herren Prof. Dr. W. Fischer (Physiol.Chem.Inst.), Priv.Doz. Dr. R. Schmitt und Dr. A. Pühler (Inst.f. Mikrobiologie) unterstützten mich durch wertvolle Ratschläge.

Frau Lefrank, Frau Flach und Fräulein Ott sei herzlich gedankt für eine hervorragende technische Assistenz und Frau Cseley für die Erledigung aller Schreibarbeiten.

Dem Verband der Chemischen Industrie danke ich für ein Promotionsstipendium.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Einleitung	1
1.	Bekannte Ergebnisse über den Transport und die Phosphorylierung bei Bakterien	3
1.1.	Definitionen	3
1.1.1.	Der Transport	3
1.1.2.	Der aktive Transport	3
1.1.3.	Die erleichterte Diffusion	4
1.1.4.	Die Gruppentranslokation	4
1.1.5.	Die Permease	5
1.2.	Beispiele für aktiven Transport und erleichterte Diffusion	5
1.2.1.	ß-Galaktosid-Transport bei Escherichia coli als Beispiel des aktiven Transports	5
1.2.2.	Erleichterte Diffusion bei E. coli	8
1.3.	Allgemeine Ergebnisse über das Phosphoenolpyruvat-abhängige Zucker-Phosphotransferase-System	9
1.3.1.	Das PEP-abhängige Phosphotransferase-System als Beispiel der Gruppentranslokation	9
1.3.2.	Verbreitung des PEP-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-Systems	11
1.4.	Spezielle Ergebnisse über das PEP-abhängige Phosphotransferase-System	13
1.4.1.	Das PEP-abhängige Glukose-Phosphotransferase-System bei E. coli	13
1.4.2.	Das PEP-abhängige Fruktose-Phosphotransferase-System bei E. coli und A. aerogenes	15
1.4.3.	Das PEP-abhängige Laktose-Phosphotransferase-System bei Staphylococcus aureus	15
1.4.3.1.	Die Komponenten des PEP-abhängigen Laktose-Phosphotransferase-Systems	15
1.4.3.2.	Eigenschaften der Mutanten von S. aureus, denen Komponenten des PEP-abhängigen Laktose-Phosphotransferase-Systems fehlen	18

Seite

1.4.4.	Bekannte Ergebnisse über das PEP-abhängige Sorbit- und Mannit-Phosphotransferase-System bei Bakterien	19
1.4.4.1.	Vergleich des Sorbit- und Mannit-Metabolismus bei Salmonella typhimurium	19
1.4.4.2.	Weitere PEP-abhängige Hexit-Phosphotransferasen bei Bakterien	20
1.4.5.	Komplementation der einzelnen Komponenten des Phosphotransferase-Systems	21
1.4.6.	Die Lokalisierung der Gene des PEP-abhängigen Phosphotransferase-Systems bei Enterobakterien	22
1.5.	Andere Primärschritte des Metabolismus von Hexiten	24
1.5.1.	Die Dehydrierung von Sorbit und Mannit zu Fruktose	24
1.5.2.	Die Dehydrierung von Sorbit zu Glukose	25
1.5.3.	Die Dehydrierung von Sorbit zu Sorbose	26
1.5.4.	Die Phosphorylierung bei nichtfermentierbaren Zuckeranaloga	27
1.6.	Bekannte Ergebnisse über den Zuckertransport und die Phosphorylierung bei Streptokokken	27
1.6.1.	Die Phosphorylierung von Mannit bei Strep. faecalis	27
1.6.2.	Das PEP-abhängige Laktose-Phosphotransferase-System bei Strep. lactis	27
1.6.3.	Das PEP-abhängige Glukose-Phosphotransferase-System bei Strep. salivarius	28
1.6.4.	Der Leloir-Weg beim Galaktoseabbau durch Streptokokken der Gruppe H	29
1.7.	Sensitivität für Zuckerphosphate bei Stoffwechselmutanten	30
1.8.	Einfluß von Fluorid	30
1.8.1.	Frühere Arbeiten über den Einfluß von NaF auf intakte Zellen	30
1.8.2.	Spezielle Modelle über den Einfluß von NaF auf den Transport	32

		Seite
1.8.2.1.	Effekt von NaF auf das PEP-abhängige Phosphotransferase-System bei E. coli	32
1.8.2.2.	Effekt von NaF auf das PEP-abhängige Glukose-Phosphotransferase-System bei Strep.salivarius	32
1.9.	Ziel dieser Arbeit	34
2.	Material und Methoden	35
2.1.	Stämme	35
2.2.	Chemikalien	35
2.3.	Kulturmedien	37
2.3.1.	Stammerhaltungskulturen	37
2.3.2.	Flüssigmedien	37
2.4.	Vorbereitung der Bakterien für den Versuch	38
2.5.	Bestimmung der Aufnahmerate	38
2.6.	Extraktion der Zellen mit Lösungsmitteln	39
2.7.	Dünnschichtchromatographie	40
2.8.	Identifizierung der Metaboliten	41
2.8.1.	Färbemethoden	41
2.8.1.1.	Nachweis von Phosphatestern	41
2.8.1.2.	Nachweis von 2-Desoxy-D-Sorbit und seinen Derivaten	41
2.8.2.	Identifizierung durch Enzymtests	44
2.8.3.	Markierung der Zuckerphosphate mit ^{32}P	44
2.8.4.	Spaltung von Zuckerphosphaten mit saurer Phosphatase	46
2.9.	Test des Phosphat-Donators der Phosphorylierungsreaktion	46
2.9.1.	Test mit "toluolbehandelten" Zellen	46
2.9.2.	Phosphorylierung im "Rohextrakt"	49
2.10.	Zellaufschlußverfahren	50
2.10.1.	Ultraschallbehandlung	50
2.10.2.	Gefrierschockbehandlung	50
2.10.3.	Behandlung im Homogenisator	50

		Seite
2.11.	Einfluß von Stoffwechselinhibitoren und Proteinreagenzien auf Transport und Stoffwechsel	51
2.11.1.	Einfluß verschiedener NaF-Konzentrationen	51
2.11.2.	Einfluß anderer Stoffwechselinhibitoren und Proteinreagenzien	51
2.12.	Kompetitive Hemmung der Aufnahme	52
2.13.	Rücktransport durch Zugabe eines zweiten Substrats	53
2.14.	Indikator-Agar-Platten	54
2.15.	Die Mutagenese	55
2.15.1.	Mutation durch UV-Strahlen	55
2.15.2.	Mutation mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG)	55
2.15.2.1.	Erzeugung von Sorbit-Mutanten	55
2.15.2.2.	Erzeugung von Mannit-Mutanten	56
2.16.	Isolierung von Mutanten	56
2.17.	Biochemische Charakterisierung der Mutanten	58
2.17.1.	Bestimmung der Aufnahmerate und des intrazellulären Zustands des Substrats	58
2.17.2.	Bestimmung der Aktivität der PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase	58
2.17.3.	Bestimmung der spez. Aktivität der Sorbit-6-P-DH bzw. Mannit-1-P-DH	59
3.	Ergebnisse des Hexitstoffwechsels	61
3.1.	Aufnahmeraten	61
3.2.	Intrazellulärer Zustand der aufgenommenen Substrate	68
3.3.	Untersuchung des Phosphat-Donators der Phosphorylierung	68
3.4.	Einfluß von NaF auf den Transport und Metabolismus	72
3.5.	Einfluß anderer Stoffwechselinhibitoren	78
3.6.	Effekt von Proteinreagenzien	78

		Seite
3.7.	Kompetitive Hemmung der Aufnahme	80
3.8.	Rücktransport durch Zugabe eines anderen Substrats	84
3.9.	Diskussion	89
4.	Transport und Phosphorylierung bei Hexosen und Disacchariden	95
4.1.	Vorbemerkungen	95
4.2.	Aufnahmeraten von Glukose und Glukose-Analoga	95
4.3.	Untersuchung des Phosphat-Donators der Phosphorylierung	99
4.4.	Einfluß von NaF auf den Transport und Abbau von Glukose in intakten Zellen	101
4.5.	Kompetitive Hemmung der Aufnahme	105
4.6.	Rücktransport von α-Methylglukose durch die Zugabe eines zweiten Substrats	105
4.7.	Diskussion	109
5.	Mutanten	112
5.1.	Vorbemerkungen	112
5.2.	Indikator-Agar-Platten	113
5.3.	Mutanten durch UV-Bestrahlung	115
5.4.	Die Mutagenese mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG)	115
5.5.	Das Säurebildungsvermögen der Mutanten	118
5.6.	Biochemische Charakterisierung der Mutanten	124
5.7.	Untersuchungen an den Stämmen 290, 407 und 431	135
5.8.	Diskussion	140
6.	Zusammenfassung	147
6.1.	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des Zuckermetabolismus	147
6.2.	Der Transport und die Phosphorylierung bei den Hexiten Sorbit und Mannit	148
6.3.	Der Transport und die Phosphorylierung bei den Hexosen und Disacchariden	151
6.4.	Erzeugung, Isolierung und Charakterisierung von Stoffwechselmutanten	152

Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A. aerogenes	Aerobacter aerogenes
ATP	Adenosintriphosphat
CAP	Chloramphenicol
cpm	"counts per minute"
D(ioxan)-Szint	Dioxan-Szintillatorlösung
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diäthylaminoäthanol
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
2-Dsorb	2-Desoxysorbit
Dul	Dulcit
E. coli	Escherichia coli
F-1-P	Fruktose-1-Phosphat
F-6-P	Fruktose-6-Phosphat
F-1,6-P_2	Fruktose-1,6-diphosphat
Fru	Fruktose
Gal	Galaktose
G-1-P	Glukose-1-P
G-6-P	Glukose-6-P
Glu	Glukose
HPr	hitzebeständiges Protein
Lac	Laktose
log	logarithmisch
LSC	Flüssigszintillationszähler
M-1-P	Mannit-1-P
αMGlu	α-Methylglukose
Man	Mannit
NAD^+, NADH	ß-Nicotinamid-adenin-dinukleotid
$NADP^+$, NADPH	ß-Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat

NNMG	1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin
O.D.	Optische Dichte
3-O-Msorb	3-O-Methylsorbit
-P	Phosphosäureester
PCMB	p-Chlormercuribenzoat,NaSalz
PEP	Phosphoenolpyruvat
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyl-oxazyl) benzol
PPO	2,5-Diphenyl-oxzol
PS	Polysaccharid
PTS	PEP-abhängiges Zucker-Phosphotransferase-System
RNA	Ribonukleinsäure
S. typhimurium	Salmonella typhimurium
S. aureus	Staphylococcus aureus
S-6-P	Sorbit-6-P
Sac	Saccharose
Sor	Sorbit
Strep.	Streptococcus
T(oluol)-Szint	Toluol-Szintillatorlösung
TMG	ß-Methylthiogalaktosid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridyldiphosphat

Die Bezeichnungen für Säuren und ihre Anionen werden synonym verwendet und Enzyme durch Trivialnamen beschrieben.

Einleitung

Seit Orland et al.[1] 1954 mit "gnotobiotischen" Ratten zeigen konnten, daß ohne Bakterien keine Karies auftrat und daß säurebildende Streptokokken[2] als Reinkultur und einzige Bakterienart überimpft, kariöse Läsionen verursachen können, ist die Rolle der Mikroorganismen bei der Entstehung der Karies unbestritten. Man hat inzwischen versucht, genauer festzulegen, welche Komponenten zusammenwirken müssen, damit Karies entstehen kann und König[3] nennt die folgenden Faktoren:

1. Wirtsorganismus mit kariesanfälligen Zähnen
2. Mikroorganismen
3. Substrat für die Mikroorganismen
4. Zeit

Unser Arbeitskreis beschäftigt sich mit den Faktoren 3 und 4. Dallmeier[4][5] zeigte, daß Strep. mutans[6], die neben Strep. sanguis[7] am häufigsten in Zahnplaques vorkommen, auch die Hexite Sorbit und Mannit zu Säuren abbauen[8]. Jedoch ist das Säurespektrum gegenüber dem Glukoseabbau bei diesen Substraten zugunsten eines größeren Anteils an Ameisensäure, Essigsäure und Äthanol auf Kosten der Milchsäure verschoben. Ein Abbau der Hexite war nur nach einer Induktion möglich. Eine wesentliche Rolle für die Säurebildung spielt die Substratzufuhr. Um Aussagen über die Wirksamkeit einiger kariesprophylaktischer Maßnahmen machen zu können, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Enzyme an der Substrataufnahme beteiligt sind und

unter welchen Bedingungen und wie schnell Substrat transportiert wird und wie die Aufnahme und der Metabolismus beeinflußt werden können.

1. Bekannte Ergebnisse über den Transport und die Phosphorylierung bei Bakterien

1.1. Definitionen

1.1.1. Der Transport

Der Cytoplasmamembran der Bakterien kommt die Aufgabe der Regulation des Stoffaustausches zu. Sie ist für kleine Moleküle und Ionen durchlässig, besitzt für größere Moleküle wie den Zuckern oder Aminosäuren aber nur eine selektive Permeabilität. Eine Passage größerer Moleküle durch die Membran ist nur mit Hilfe bestimmter Proteine möglich. Der Begriff Transport beschreibt in der Biochemie das Zusammenwirken dieser Komponenten, das es ermöglicht, daß Moleküle aus dem Medium durch die Membran ins Cytoplasma gelangen und dort für den Stoffwechsel zur Verfügung stehen.

1.1.2. Der aktive Transport

Beim aktiven Transport wird das Substrat unverändert gegen einen elektrochemischen oder osmotischen Gradienten im Cytoplasma angereichert. Allgemein wird angenommen, daß dazu metabolische Energie und ein spezieller Membran-"Carrier" notwendig sind. Es werden drei Schritte für den Transport postuliert:

a) Das Binden eines Substrats an einen Rezeptor ("Carrier").

b) Der Carrier-Substrat-Komplex, der an der Außenseite der Membran gebildet wurde, durchquert die Membran.

c) Der Komplex wird an der Innenseite der Membran so verändert, daß er nur noch geringe Affinität zum Substrat hat. Das Substrat wird ins Cytoplasma freigesetzt und der Carrier wandert wieder an die Außenseite der Membran.

1.1.3. Die erleichterte Diffusion (facilitated diffusion)

Bei der erleichterten Diffusion wird vermutet, daß das Substrat sich reversibel mit einem spezifischen "Carrier" der Membran verbindet. Der Carrier oder der Carrier-Substrat-Komplex schwingt sehr schnell zwischen der äußeren und inneren Membran und bindet bzw. setzt dabei Moleküle frei. Für diesen Vorgang ist der dritte Schritt des aktiven Transports, nämlich die Kopplung an metabolische Energie, nicht erforderlich. Sie tritt entweder unter den physiologischen Bedingungen nicht auf oder sie kann durch die Versuchsanordnung ausgeschaltet werden.

1.1.4. Die Gruppentranslokation

Dieser Transportmechanismus ist wiederum von metabolischer Energie abhängig. Bei diesem Prozeß wird das Substrat chemisch verändert. Deshalb zählt auch die Gruppentranslokation nicht als "klassischer" aktiver Transport. Die Aufnahme von Zuckern, die mit einer Phosphorylierung gekoppelt ist, ist eine solche Gruppentranslokation und wird "vektoriale Phosphorylierung"[9] (vectorial phosphorylation) genannt.

1.1.5. Die Permease

Der umstrittene Begriff Permease ist weitverbreitet im Gebrauch mit einer Vielzahl von Bedeutungen. Er war ursprünglich vorgeschlagen worden, um sich auf das ganze Transportsystem zu beziehen (Cohen und Monod[10]). Neuerdings wurde angeregt, daß die stereospezifischen Proteinkomponenten als Permease bezeichnet werden sollten und der ganze Prozeß als Permease-System angesprochen werden sollte (Cohen und Kepes[11]). Eine Schwierigkeit bei dem Gebrauch dieses Ausdruckes ist die Tendenz anzunehmen, daß ein einziges Protein für den Transport verantwortlich sein sollte.

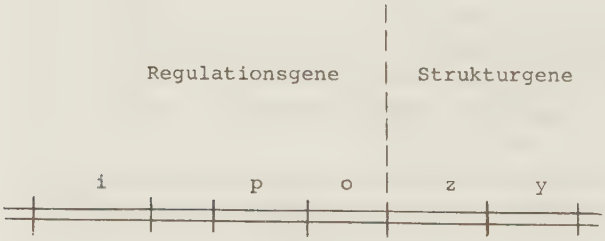
1.2. Beispiele für aktiven Transport und erleichterte Diffusion

1.2.1. ß-Galaktosid-Transport bei Escherichia coli als Beispiel des aktiven Transport

Der ß-Galaktosid-Transport bei E. coli ist das am besten bekannte Transportsystem bei Bakterien, da an diesem System die Regulation der Genaktivität 1961 von Jacob und Monod[12] in einer Modellvorstellung erstmalig beschrieben wurde. In den darauffolgenden Jahren wurde dieses Modell durch zahlreiche Arbeiten bestätigt und verfeinert.

Glukose und Galaktose, die beiden Komponenten der Laktose, sind über eine ß-Galaktosidbindung miteinander verknüpft. Um dieses Kohlenhydrat als Kohlen-

stoffquelle ausnützen zu können, sind bei E. coli zwei Enzyme unbedingt notwendig. Ein für den Transport des Zuckers aus dem Medium in das Cytoplasma verantwortliches membrangebundenes Enzym, die Permease, und ein sich im Cytoplasma befindliches Enzym, die ß-Galaktosidase, von der die Spaltung der ß-Galaktosidbindung ausgeführt wird. Der Transport und die Spaltung können nur nach Induktion durch Laktose oder Laktose-Analoga (z.B. ß-Methylthiogalaktosid, TMG) erfolgen. Beide Enzyme werden durch Gene eines Operons codiert (y = Gen der Permease, z = Gen der ß-Galaktosidbindung), die unmittelbar aneinandergereiht sind. Die Enzymsynthese wird durch das Produkt eines eng benachbarten Genes i kontrolliert. Das Produkt dieses i-Genes ist ein Protein, der Repressor, der sich entweder frei im Cytoplasma befindet oder an einen DNS-Abschnitt gebunden ist. Dieser Repressorbindungsort, der Operator o, befindet sich unmittelbar vor den Strukturgenen. Wichtig für die Kontrolle der Gen-Ablesung ist noch ein weiterer Kontrollort, der Promoter. Am Promoter heftet sich RNS-Polymerase an, um die Transkription des Operons zu beginnen.

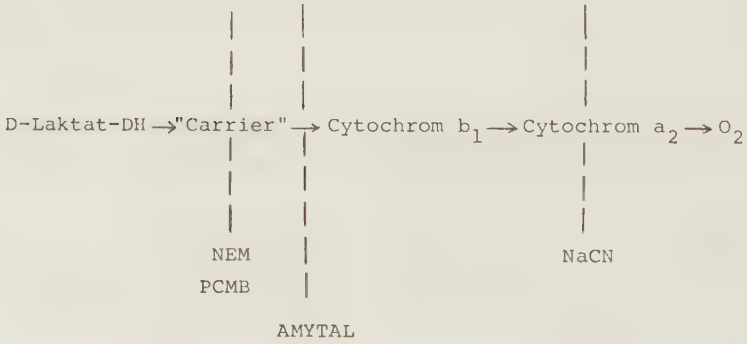


Auf welche Weise energiereiche Verbindungen, die beim Stoffwechsel erzeugt werden, den Transport beeinflussen, ist noch nicht geklärt. Scarborough et al.[13] nahmen die Beteiligung von ATP beim Laktosetransport an. Es konnte gezeigt werden, daß unter anaeroben Bedingungen Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung die TMG-Aufnahme blockieren, aber den Gehalt an ATP in den Zellen nicht verändern[14]. Nach der Entdeckung des "Permease"-Proteins[15] (M-Protein) als Produkt des Permease-Gens untersuchte der Arbeitskreis Kaback[16] den Einfluß verschiedener Metaboliten und Cofaktoren auf dieses Protein und damit auf den Transport. Für die Untersuchungen wurden isolierte Membran-Vesikeln als überschaubare Modelle des Transports gewählt. D-Laktat wurde in den Membranvesikeln zu Pyruvat umgesetzt. Dies beschleunigte die Aufnahmerate der ß-Galaktoside. Innerhalb eines kurzen Zeitintervalls war die Konzentration an ß-Galaktosid in den Vesikeln 100-mal höher als im Medium. Die aufgenommenen ß-Galaktoside lagen unphosphoryliert vor. Diese Verknüpfung zwischen Transport und Stoffwechsel und mögliche Inhibitoren ist im folgenden Kapitel noch ausführlicher dargestellt.

Ein ähnlicher Mechanismus der Kopplung des Transports an eine Laktatdehydrogenase konnte auch für die Zucker Galaktose, Arabinose, Glucuronsäure und Gluconsäure[17] nachgewiesen werden. Für all diese Substrate war ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Zuckerphosphotransferase-System nicht auffindbar.

1.2.2. Erleichterte Diffusion bei E. coli

Winkler und Wilson[18] haben sehr intensiv die Auswirkung von verschiedenen Inhibitoren auf das ß-Galaktosidtransportsystem bei E. coli untersucht. Durch diese Substanzen wird aus dem aktiven Transport eine erleichterte Diffusion, d.h. die Konzentration im Cytoplasma steigt maximal bis sie gleich der Konzentration im Medium ist. Über die Wirkungsweise der einen Gruppe von Inhibitoren, den Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung (2,4-Dinitrophenol, Carbonylcyanid-m-chloro-phenylhydrazone, Natriumazid) kann man, nachdem man festgestellt hatte, daß der aktive Transport ATP-unabhängig ist[19], bisher nichts aussagen, denn diese Reagenzien sind ohne Einfluß auf die Laktatdehydrogenase. Für den Wirkungsmechanismus von p-Chlormercuribenzoat und N-Äthylmaleimid entwickelten Kaback und Barnes[20] ein interessantes Modell.



NEM : N-Äthylmaleimid

PCMB: p-Chlormercuribenzoat

Ein "Carrier" besitzt an einer für seine Struktur wichtigen Stelle ein Disulfid. Im oxidierten Zustand des Carriers ist an einer dem Medium zugewandten Seite ein Ort mit hoher Affinität zu einem Zuckermolekül. Dort an der Außenseite der Membran wird ein Molekül gebunden. Bei der Laktatoxidation gewonnene Elektronen werden über eines oder mehrere Flavoproteine auf den Carrier übertragen. Diese Elektronen reduzieren das "kritische" Disulfid. Dadurch wird ein Konformationswechsel ausgelöst, das gebundene Zuckermolekül gelangt an die Innenseite der Membran. Diese neue Struktur besitzt nur eine sehr geringe Affinität zum Zuckermolekül. Der Zucker wird deshalb an das Cytoplasma abgegeben. Die Oxidation der "Sulfhydryl"-Form des Carriers erfolgt durch das Enzym Cytochrom b_1 der Atmungskette.

Die reduzierte Form des Carriers kann außerdem "vibrieren" und führt auf diese Weise einen energieunabhängigen, "carrier"-abhängigen Transport mit niedriger Affinität durch.

1.3. Allgemeine Ergebnisse über das Phosphoenolpyruvat-abhängige Zucker-Phosphotransferase-System

1.3.1. Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System als Beispiel der Gruppentranslokation

1964 wurde von Kundig et al.[21)] ein Transportsystem bei Bakterien beschrieben, das den Transfer des Phosphats vom Phosphoenolpyruvat auf zahlreiche Zucker

nach folgenden mehrstufigen Reaktionsschritten beschrieb.

$$\text{PEP} + \text{HPr} \xrightleftharpoons{\text{Enzym I, } Mg^{++}} \text{Pyruvat} + \text{P-HPr} \quad (1)$$

$$\text{P-HPr} + \text{Zucker} \xrightarrow{\text{Enzym II, } Mg^{++}} \text{Zuckerphosphat} + \text{HPr} \quad (2)$$

Im ersten Reaktionsschritt wird die Phosphatgruppe von PEP im Cytoplasma durch ein lösliches Enzym I auf ein Stickstoffatom eines Histidinmoleküls, das Teil eines kleinen Proteins ist, dem "hitzebeständigen" Protein (heat-stable protein-HPr), übertragen. Den anschließenden Transfer der Phosphatgruppe von der aktiven Form des phosphorylierten Proteins auf den Zucker katalysiert der membrangebundene Enzym II-Komplex. Da - im Gegensatz zu HPr und Enzym I - das Enzym II stereospezifisch ist, ist eine Gruppe von Enzym II-Proteinen bekannt. Diese stereospezifischen Enzyme müssen mit Ausnahme von Glukose induziert[21)22)23)24)] werden, während die nichtspezifischen Enzyme HPr und Enzym I konstitutiv synthetisiert werden.[23)24) 25)] Sie sind auch in Abwesenheit von Zuckern vorhanden.

Beim phosphoenolpyruvatabhängigen Zucker-Phosphotransferase-System (PTS) ist die Aufnahme des Zuckers also gekoppelt mit seiner Phosphorylierung. Eine Dephosphorylierung im Cytoplasma nach erfolgtem Transport wurde nicht gefunden. Sie ist auch unwahrscheinlich, da oft keine entsprechenden Dehydrogenasen, die die nicht phosphorylierten Zucker oxidieren, vorhanden sind.

1.3.2. Verbreitung des PEP-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-Systems

Roseman[25] zeigte, daß das PTS den Bakterien, die die anaerobe Glykolyse ausführen, äußerst wichtige physiologische Vorteile bietet. Der aktive Transport, der es erlaubt Substrat gegen einen Konzentrationsgradienten im Cytoplasma anzusammeln, ist - wie in Kap. 1.2.1. beschrieben - nur möglich, wenn energiereiche Verbindungen aus dem Stoffwechsel zur Verfügung stehen. Zusätzlich erfordert die Phosphorylierung des aufgenommenen Zuckers im Cytoplasma einen weiteren energiereichen Phosphatdonator (meist ATP). Die Kopplung der Substrataufnahme mit der Phosphorylierung des Substrats im PEP-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-System dagegen braucht nur ein Molekül Phosphoenolpyruvat. Dieses System erlaubt also die Einsparung von Stoffwechselenergie gegenüber den bisher erörterten Transportwegen. Es ist besonders dann für die Zellen von Vorteil, wenn sie unter Bedingungen der begrenzten Energiegewinnung leben müssen.

Beim aeroben Stoffwechsel kann der Zucker über die Atmungskette bis zu Wasser und Kohlendioxid abgebaut werden. PEP spielt daher keine Rolle als wichtige energiereiche Verbindung. Durch die oxidative Phosphorylierung werden außerdem relativ große Mengen an ATP produziert. Deshalb ist ein "energiesparsamer" Transportweg für Aerobier nicht erforderlich. Anders ist es jedoch bei den Anaerobiern, bei denen die Glykolyse der wichtigste Stoffwechselweg ist und

PEP eine bedeutende energiereiche Verbindung darstellt. Das im Stoffwechsel anfallende PEP kann direkt, ohne weitere energieverbrauchende Umwandlungen (z.B. in ATP), dem Zuckertransportsystem zugeführt werden.

Es ist daher nicht erstaunlich, daß es trotz intensiver Suche durch Romano et al.[26] nicht gelang, das PTS für eine Reihe strikter Aerobier (Arthrobacter globiformis, Azotobacter vinelandeii, Mycobacterium smegmatis, Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa) nachzuweisen. Für einige Stämme von Bacillus subtilis und Achromobacter parvulus, ebenfalls Aerobier, wurde von den gleichen Autoren ebenso wie für die folgenden fakultativen Aerobier Bacillus cereus, B. megaterium, Corynebacterium ulcerans eine, wenn auch sehr unterschiedliche, PEP-abhängige Glukosephosphotransferase-Aktivität gemessen.

Sehr eingehend wurde das Spektrum der nach dem PEP-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-System transportierten Zucker bei den folgenden Bakterien untersucht und folgende Verbreitung gefunden:

E. coli[27]: Glukose, Mannose, Mannit, Fruktose, Sorbit

Aerobacter aerogenes[28]: Mannit, Sorbit, Glukose, Fruktose, Maltose, ß-Galaktoside

Salmonella typhimurium[29]: Glukose, Fruktose, Mannose, Mannit, Sorbit, N-Acetylglukosamin, Maltose, Melbiose, Glycerin, Arabinose, Galaktose, Ribit

Staphylococcus aureus[30]: Saccharose, Maltose, Laktose, Trehalose, Galaktose, Fruktose, Mannit, Sorbit, Ribose

Da zum Teil recht erhebliche Unterschiede zwischen den PTS-Systemen der Enterobakterien und der grampositiven Bakterien existieren, sollen in den folgenden Kapiteln Besonderheiten der einzelnen Systeme herausgestellt werden.

1.4. Spezielle Ergebnisse über das PEP-abhängige Phosphotransferase-System

1.4.1. Das PEP-abhängige Glukose-Phosphotransferase-System bei Escherichia coli

Da an E. coli das PTS entdeckt wurde, ist es bei diesen Bakterien inzwischen besonders eingehend untersucht worden. Was bei E. coli nachgewiesen wurde, konnte auch für die anderen Enterobakterien A. aerogenes und S. typhimurium bestätigt werden. Die Komponenten, die wie im Kapitel 1.3.1. beschrieben, an den mehrstufigen Reaktionsschritten beteiligt sind, wurden weitgehend gereinigt und wie folgt charakterisiert:

Anderson et al.[31] isolierten das HPr aus E. coli und bestimmten sein Molekulargewicht mit 9.600. Obwohl das Protein in E. coli (und S. typhimurium) zwei Histidinmoleküle enthält, war die maximale Menge an Phosphat, die gebunden werden konnte, 1 Mol pro Mol Protein. Daraus wurde geschlossen, daß nur an eines

der Histidine ein Phosphat gebunden werden kann. Die Phosphatgruppe am Phospho-HPr ist an der N-1-Position des Imidazol-Rings gebunden, wie durch Isolierung von N-1-Phosphorylhistidin bewiesen werden konnte[32].

Die Enzyme I und II sind im hochgereinigten Zustand nur 1-2 Tage stabil. Das im Cytoplasma lösliche Enzym I wurde 500-fach angereichert[33] und sein Verhalten gegenüber Sulfhydrylreagenzien getestet. N-Äthylmaleimid desaktiviert das Protein irreversibel, während Mercuribenzoeat- und Dithionitrobenzoesäure-Inhibitionen durch die Zugabe von 2-Mercaptoäthanol, Gluthation oder Cystein aufgehoben werden können. Das membrangebundene Enzym II konnte durch eine Behandlung mit n-Butanol/Harnstoff in Lösung gebracht und teilweise gereinigt werden[32]. Zugleich gelang die Zerlegung des Enzyms II in drei Komponenten, zwei Proteine (II A und II B) und ein Phosphatidylglycerol. Eine weitere Fraktionierung des Enzyms II A-Komplexes führte zur Isolierung dreier Enzym II A-Proteine, von denen jedes für einen der Zucker Glukose, Mannose oder Fruktose spezifisch war. Eine Reaktivierung des Enzyms nach dem Zusammenbau aus isolierten Proteinen, führte zu einem Aktivitätsmaximum, wenn zunächst II A und II B verbunden wurden und erst dann Phosphatidylglycerol und Ca^{++} oder Mg^{++} zugegeben wurden. Die Rolle des Lipids wurde dahingehend geklärt, daß es in der Struktur des Enzymkomplexes eine wichtige Position einnimmt[34]. Der zweite Schritt, die Übertragung des Phosphats von P-HPr auf den Zucker geschieht bei E. coli derart, daß P-HPr zunächst das Enzym II A phosphoryliert und dann das membrangebundene Enzym II B die Phosphorylierung des Zuckers katalysiert. Enzym II A ist also

von ähnlicher Funktion wie der Factor III des in einem speziellen Kapitel (1.4.3.) beschriebenen Laktose-PTS von S. aureus.

1.4.2. Das PEP-abhängige Fruktose-Phosphotransferase-System bei E. coli und A. aerogenes

Mit Ausnahme von Fruktose werden alle bisher geteste-ten Zucker und Zuckeralkohole, die durch ein PTS in die Zellen transportiert werden, am C-6 Atom des Moleküls phosphoryliert. Fraenkel[35] entdeckte eine Phosphorylierung von Fruktose in der Position 1 bei Untersuchungen von E. coli. Fastgleichzeitig wurde sie auch bei A. aerogenes[36][37] nachgewiesen.

$$\text{PEP} + \text{HPr} \xrightleftharpoons{\text{Enzym I, } Mg^{++}} \text{Pyruvat} + \text{P-HPr}$$

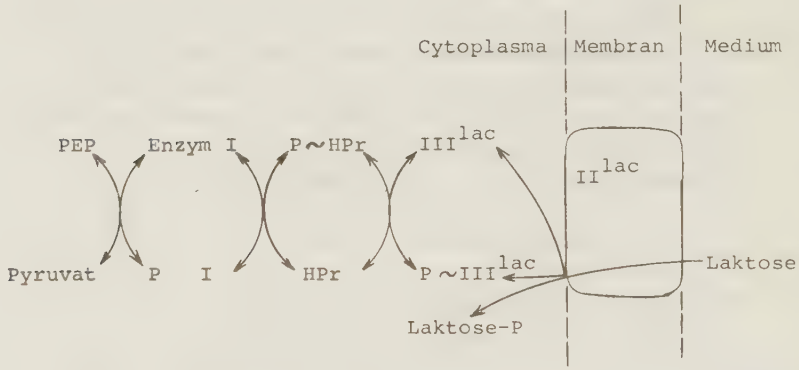
$$\text{P-HPr} + \text{Fruktose} \xrightarrow{\text{Enzym II, } Mg^{++}} \text{Fruktose-1-P} + \text{HPr}$$

1.4.3. Das PEP-abhängige Laktose-Phosphotransferase-System bei Staphylococcus aureus

1.4.3.1. Die Komponenten des PEP-abhängigen Laktose-Phosphotransferase-Systems

Man hatte in früheren Arbeiten[38][39] bei Laktose-induzierten Zellen von S. aureus keine ß-Galaktosidase-Aktivität im zellfreien Extrakt messen können. Daher nahm man an, daß es sich um ein sehr instabiles Enzym

handeln würde. Hengstenberg et al.[40] entdeckten, daß die ß-Galaktosidase von S. aureus nur eine durch das PTS phosphorylierte Laktose spalten konnte. Die Laktose ist am C-6 Atom der Galaktose phosphoryliert. Simoni et al.[41] formulierten folgende Verknüpfung des Transfers von Phosphat aus PEP auf Laktose durch ein PTS.



Die einzelnen Komponenten und die Reaktionsschritte wurden mit folgenden Eigenschaften beschrieben:

Bis zur Homogenität gereinigtes HPr[41] hat ungefähr das gleiche Molekulargewicht wie das HPr aus E. coli isoliert. Das Protein enthält aber 1 Histidin- und 2 Tyrosin-Reste, während dasjenige aus E. coli 2 Histidinreste und kein Tyrosin besitzt. Der erste Reaktionsschritt, der Transfer des Phosphats von PEP auf HPr unter Katalyse von Enzym I ist zuckerunspezifisch und ähnlich wie bei E. coli. Der neuartige zweite Schritt hat keine Analogie im PTS gramnegativer Bakterien. In diesem reversiblen Phosphoryltransfer,

in dem das nicht spezifische Phospho-HPr als Substrat für den zuckerspezifischen Phosphocarrier III^{lac} dient, ist die Schlüsselstellung für eine Kopplung der nicht spezifischen Zellenergie an den zuckerspezifischen Membranprozeß. Phospho-III^{lac} unterscheidet sich von P-HPr in zwei wichtigen Punkten[42]. Das Phosphat ist am N-3 des Imidazolrings des Histidins im Phospho-III^{lac} gebunden, während in Phospho-HPr die Bindung am N-1 erfolgt. Außerdem besteht der Factor III^{lac} mit einem Molekulargewicht von 35.000 aus drei Untereinheiten und kann drei Phosphate bilden. Die interessanteste Reaktion ist die Katalyse des Transfers der Phosphatgruppe durch das Enzym II^{lac} vom Phospho-III^{lac} auf Laktose und seine Analoga. Wahrscheinlich bilden die drei Komponenten Enzym II^{lac}, Phospho-III^{lac} und der Zucker einen ternären Komplex. Ein Phospho-Enzym II^{lac} als Intermediäres konnte nicht nachgewiesen werden. Das zuckerspezifische Enzym II^{lac} konnte nicht wie bei E. coli von der Membran gelöst werden.

Eine Modellvorstellung, wie die Passage des Moleküls durch die Membran bei diesem PEP-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-System ablaufen könnte, wurde bisher noch nicht entwickelt.

Der Laktoseabbau kann durch Laktose und Galaktose induziert werden. Der tatsächliche Induktor ist sehr wahrscheinlich Galaktose-6-Phosphat oder ein Folgeprodukt. Denn Mutanten, die kein Galaktose-6-Phosphat bilden, werden nicht durch Galaktose induziert. Galaktose-6-Phosphat ist jedoch in diesen Mutanten ein effektiver Induktor[43].

1.4.3.2. Eigenschaften der Mutanten von S. aureus, denen Komponenten des PEP-abhängigen Laktose-Phosphotransferase-Systems fehlen

Am Beispiel von S. aureus soll aufgezeigt werden, wie sich das Fehlen von einer oder mehrerer Komponenten des Laktose-PTS auf den Zuckermetabolismus auswirkt. Hengstenberg et al.[44] isolierten als erste solche Mutanten und charakterisierten sie auch biochemisch. Bestätigt wurden ihre Ergebnisse durch Simoni und Roseman[45].

1. Mutanten, denen das Enzym I fehlt, können eine Reihe von Zuckern nicht fermentieren und ß-Methyl-Glukopyranosid (ein Glukose-Analogon) und Thiomethyl-ß-galaktopyranosid (ein Laktose-Analogon) nicht aufnehmen.

2. Mutanten, denen das Protein HPr fehlt, sollten sich wie Enzym I-Mutanten verhalten. Für S. aureus konnten bisher noch keine solche Mutanten isoliert werden. Für E. coli und S. typhmurium konnte diese Annahme bestätigt werden.

3. Mutanten, denen eines der beiden zuckerspezifischen Proteine fehlt, sind unfähig, einen bestimmten Zucker, der durch dieses Protein transportiert wird, zu verwerten. Andere Zucker werden normal fermentiert. Fehlt z.B. Factor III^{lac} oder Enzym II^{lac}, dann kann TMG nicht, aber α-MG sehr wohl aufgenommen werden.

1.4.4. Bekannte Ergebnisse über das PEP-abhängige Sorbit- und Mannit-Phosphotransferase-System bei Bakterien

1.4.4.1. Vergleich des Sorbit- und Mannit-Metabolismus bei Salmonella typhimurium

Es gibt nur eine Arbeit[46)], in der vergleichende Untersuchungen über den Sorbit- und Mannitabbau durchgeführt wurden. Das Hauptinteresse des Autors gehörte aber dem Mannit-Metabolismus. Die wichtigsten Ergebnisse sind:

1) Sorbit und Mannit werden durch PEP-abhängige Phosphotransferasen transportiert.

2) Sorbit-6-P-DH und Mannit-1-P-DH sind sehr wahrscheinlich zwei verschiedene Enzyme; denn nur Sorbit induziert S-6-P-DH, M-1-P-DH wird dabei nicht induziert. Außerdem sind die Enzymaktivitäten für S-6-P-DH und M-1-P-DH nicht gleich.

3) Mutanten, denen die M-1-P-DH fehlt und die deshalb M-1-P intrazellulär ansammeln, sind sensitiv gegen Mannit.

4) Einer dieser Mutanten fehlt neben der M-1-P-DH auch die S-6-P-DH. Von 36 Revertanten, die nicht mehr Mannit-sensitiv waren, zeigte etwa die Hälfte einen Mannit-negativen, Sorbit-positiven und die andere Hälfte einen Mannit-negativen und Sorbit-negativen Phänotyp.

5) Mutanten, die nur 1-10% der Aufnahmerate des Wildtyps für Mannit besitzen, also eine niedere PEP-abhängige Mannit-Phosphotransferase-Aktivität zeigen, haben auch eine längere Verdoppelungszeit für Sorbit als Kohlenstoffquelle.

6) Sorbit-Mutanten haben normale Verdoppelungszeiten im Mannit-Medium und eine beinahe normale Aufnahmerate für dieses Substrat.

7) Die Mannitaufnahme wird von Sorbit in den Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-3}m nicht kompetitiv gehemmt.

1.4.4.2. Weitere PEP-abhängige Hexit-Phosphotransferasen bei Bakterien

Als man für Aerobacter aerogenes in Mannit gewachsenen Zellen eine Mannit-1-P-DH-Aktivität[47] nachweisen konnte, aber keine Mannitkinase[48], testete man das damals neu entdeckte PTS als Transport- und Phosphorylierungsreaktion und fand es als den obligaten Schritt des Transports und der Phosphorylierung im Mannit-Metabolismus[28][49][50]. Auf Grund der Ergebnisse über den Sorbitabbau von Kelker und Anderson[51] und ihrer eigenen umfangreichen Arbeiten[28][49] über den Mannitstoffwechsel halten Lengeler und Lin[52] bei A. aerogenes für beide Hexite das PTS mit zwei verschiedenen Enzym II-Komplexen für wahrscheinlich. Auf Grund ähnlicher Resultate bei E. coli vermuten die gleichen Autoren auch für diese Bakterien zwei solche getrennte Systeme für die beiden Hexite[52].

Das PTS für Sorbit bzw. Mannit ist bei diesen gramnegativen Bakterien ähnlich dem bereits charakterisierten Glukose-PTS bei E. coli und besteht aus den nicht spezifischen Proteinen HPr und Enzym I und dem zuckerspezifischen Enzym II. Bei den grampositiven S. aureus[23)53)] ist zusätzlich zu den drei Komponenten der Enterobakterien jeweils die zweite stereospezifische Enzymkomponente Factor III^{mannit}, Factor III^{sorbit} und Factor $III^{fruktose}$ für die Phosphorylierung der entsprechenden Zucker notwendig. Diese Komponenten sind also analog den Komponenten des Laktose-PTS bei S. aureus. Bei den ebenfalls grampositiven Bakterien Clostridium thermocellum wurde ein PTS für Fruktose und Mannit nachgewiesen, jedoch die Komponenten noch nicht einzeln isoliert[50)]. Die Phosphorylierung von Fruktose führt zu Fruktose-1-Phosphat.

1.4.5. Komplementation der einzelnen Komponenten des Phosphotransferase-Systems

Obwohl es noch keine systematische Untersuchung über die Zusammenwirkung der aus verschiedenen Bakterien isolierten Komponenten gibt, wurde in einzelnen Arbeiten eine weitgehende Komplementierung festgestellt. So wurden die Komponenten von E. coli zu Mutanten von Bacillus subtilis[54)] und A. aerogenes[49)] zugesetzt und in jedem Fall eine Phosphotransferase-Aktivität gemessen. Umgekehrt konnten aus A. aerogenes isolierte Komponenten inaktive Enzyme in E. coli kompensieren[27)]. Ebenso ergänzten sich die Proteinkomponenten von A. aerogenes und S. typhimurium gegenseitig. Das Protein HPr von E. coli dagegen

konnte nur 5-10% der Enzymaktivität des homologen HPr bei der Phosphorylierung von TMG bei S. aureus erzielen[23]. Sehr wahrscheinlich kann P-HPr von S. aureus nicht mit den zuckerspezifischen II-A^{glu}/ II-B^{glu}-komplexen der E. coli-Membran zusammenwirken und P-HPr aus E. coli hat nur eine geringe Wechselwirkung mit Factor III^{lac} [53]. McKay[55] stellte erfolgreich Komplementationstests zwischen S. aureus mit bekannten enzymatischen Defekten und unbekannten Mutationen des Laktosetransportsystems von Strep. lactis an, um diese Mutationen zu charakterisieren. Allgemein gilt also: Komponenten aus Enterobakterien können zur Komplementation bei Enterobakterien eingesetzt werden, während sie für die grampositiven Bakterien S. aureus nur bedingt erfolgreich sind und umgekehrt.

1.4.6. Die Lokalisierung der Gene des PEP-abhängigen Phosphotransferase-Systems bei Enterobakterien

Die Anordnung der Gene des PTS ist von großem Interesse, da eine genaue Kenntnis darüber es ermöglichen würde, Aussagen über die Regulation des Transports im PTS zu machen. Die Aufklärung der Genfolge befindet sich jedoch noch in den Anfängen. Ergebnisse liegen bisher nur vom PTS bei S. typhimurium und E. coli vor.

Bei S. typhimurium[56] ist die Reihenfolge der Gene

Cys A - trz A - pts H - pts I .... crr

Cys A : Cystein-Biosynthese
trz A : Sensitivität für 1, 2, 4 - Triazol
pts H : Gen für das Protein HPr
pts I : Gen für das Enzym I
crr : codiert oder reguliert die Synthese des Factors III

Ob zwischen pts I und crr noch Gene liegen, ist noch nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen. Das Gen für das zuckerspezifische Enzym II ist nicht in dieser Genregion; denn alle Mutanten zeigten normale Aktivität für Enzym II. Es konnte aber noch nicht in der Genkarte lokalisiert werden.

Die Anordnung bei E. coli[57] wurde wie folgt beschrieben:

str A ... gua B - pur C - pts I - pts H - sup N - dsd A ... his

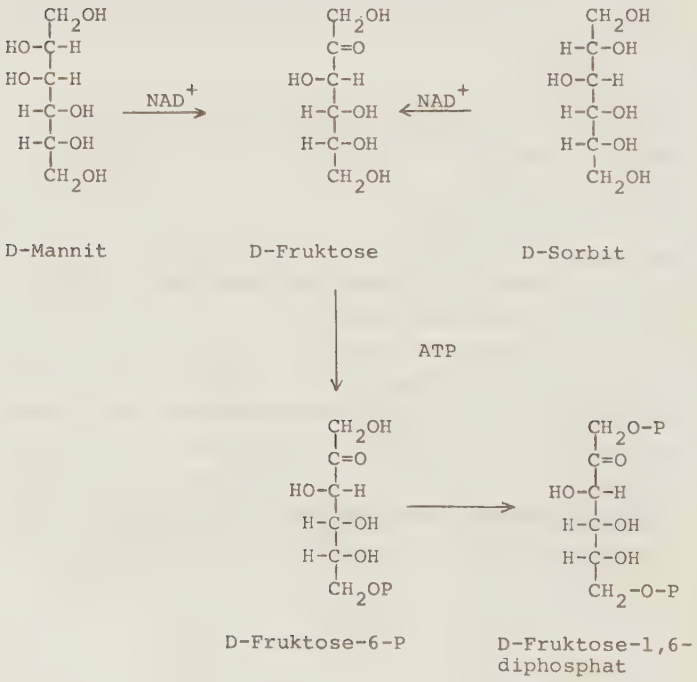
str A : Streptomycin
gua B : Guanin-Biosynthese
pur C : Suppressor der Ochre-Mutationen
dsd A : D-Serin-Deaminase
his : Histidin-Biosynthese

Auffallend ist die gegenläufige Anordnung von pts H und pts I bei E. coli bzw. S. typhimurium. Die sehr nahe Verknüpfung zwischen beiden Genen lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß beide Gene Teil eines Operons sind, während Enzym II nicht dazugehört.

1.5. Andere Primärschritte des Metabolismus von Hexiten

1.5.1. Die Dehydrierung von Sorbit und Mannit zu Fruktose

Die direkte, meist NAD^+-abhängige Oxidation der Hexite zu Fruktose wurde bei einer Reihe von Bakterien und in der Leber von Säugetieren nachgewiesen. Die wirksamen Enzyme sind die nicht besonders substratspezifischen Polyoldehydrogenasen.

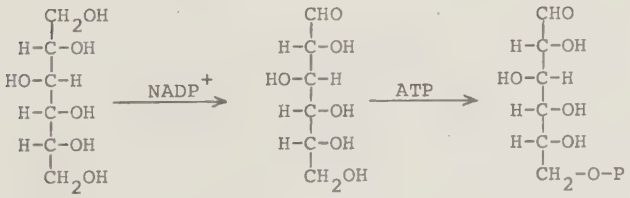


Für das Substrat Mannit wurden die Mannitdehydrogenasen nachgewiesen u.a. bei Acetobacter suboxydans[58], Azotobacter agilis[59], Pseudomonas aeruginosa[60].

Jeweils zwei Enzyme, die spezifisch sind für Sorbit und Mannit, wurden bei Bacillus subtilis[61] und Leuconostoc mesenteroides[62] gefunden. Zusätzlich wurde bei Rhizobium meliloti[63] eine Arabit-Dehydrogenase beobachtet, die neben Arabit auch Mannit umsetzt. Nach der Oxidation der Hexite zu Fruktose findet dann eine ATP-abhängige Phosphorylierung am C-6 Atom der Fruktose statt und über F-1,6-P_2 mündet der Abbauweg in den Embden-Meyerhof-Weg ein.

1.5.2. Die Dehydrierung von Sorbit zu Glukose

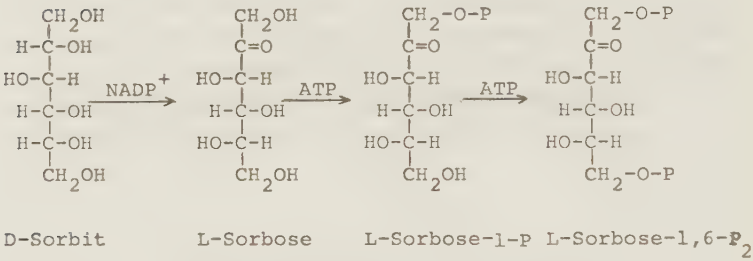
Die durch die "Aldolase-Reduktase" katalysierte direkte $NADP^+$-Oxidation von Sorbit zu Glukose wurde bisher noch nicht bei Bakterien, sondern nur in der Hefe Candida utilis[64] und in menschlichen Spermien[65] demonstriert.



D-Sorbit D-Glukose D-Glukose-6-P

1.5.3. Die Dehydrierung von Sorbit zu Sorbose

Die direkte Oxidation von D-Sorbit zu L-Sorbose ist nur ein Spezialfall. Sie konnte bisher nur beim aeroben Abbau von Sorbit durch Aerobacter suboxydans[66)67)] gezeigt werden.



Die $NADP^+$-abhängige Dehydrogenase oxidiert Sorbit zu Sorbose. Über Kinasen, die ATP-abhängig sind, erfolgt die Phosphorylierung am C-1 Atom und C-6 Atom. Der weitere Abbau erfolgt durch die Aldolasen des Embden-Meyerhof-Weges, die auch eine Sorbose-1,6-P_2-Aktivität besitzen.

Aus Gluconobacter melanogenus[68)] wurde eine ähnliche Dehydrogenase, die Xylit in einer $NADP^+$-abhängigen Reaktion zu L-Xylose[69)] dehydriert, isoliert.

1.5.4. Die Phosphorylierung bei nicht fermentierbaren Zuckeranaloga

Sehr viele Jahre galten Desoxyzucker als fermentativ unangreifbar. In den letzten 15-20 Jahren konnte man zeigen, daß Hexokinasen aus dem Hirn[70], Muskel[71] und Hefen[72] mit 2-Desoxy-D-Glukose und die Galaktokinase aus Saccharomyces fragilis[73] mit 2-Desoxy-D-Galaktose Phosphate bilden.

Eine PEP-abhängige Phosphotransferase-Aktivität, die α-Methyl-Glukose phosphoryliert, wurde inzwischen für E. coli[27], Aerobacter aerogenes[28] und S. aureus[74] nachgewiesen.

1.6. Bekannte Ergebnisse über den Zuckertransport und die Phosphorylierung bei Streptokokken

1.6.1. Die Phosphorylierung von Mannit bei Strep. faecalis

Der Abbau von Mannit durch zellfreie Extrakte von aerob gewachsenen Streptococcus faecalis verläuft über eine NAD-abhängige M-1-P-DH[75].

1.6.2. Das PEP-abhängige Laktose-Phosphotransferase-System bei Strep. lactis

Ebenso wie bei S. aureus konnten Citti et al.[76] in zellfreiem Extrakt von Strep. lactis bei über 30 Stämmen eine ß-Galaktosidase-Aktivität nicht nachweisen.

Nur ein Stamm spaltete auch im zellfreien Extrakt die Laktose. Später konnten McKay et al.[55] beweisen, daß - wie bei S. aureus - ausschließlich phosphorylierte Laktose ein geeignetes Substrat für die ß-Galaktosidase darstellt. Als einziger war der oben erwähnte Stamm in der Lage nicht phosphorylierte Laktose zu spalten. Dieser Stamm besaß kein PEP-abhängiges Laktose-Phosphotransferase-System, während es bei allen anderen Stämmen feststellbar war.

Durch Komplementationstests mit S. aureus wurden die vier Komponenten (E I, E II, HPr und F III) des PTS bei S. aureus nachgewiesen. Kashket und Wilson[77] konnten inzwischen für den nicht PEP-abhängigen Stamm zeigen, daß dort für Laktose und deren Analogen ein aktiver Transport in Gegenwart von metabolisierbaren Substraten auftritt.

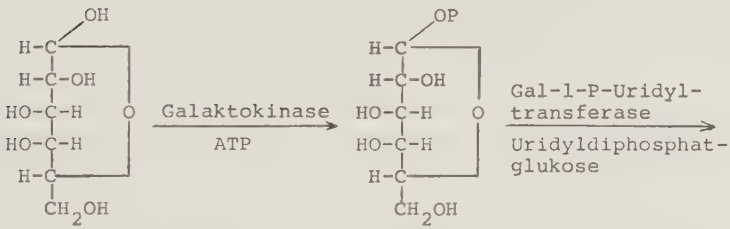
1.6.3. Das PEP-abhängige Glukose-Phosphotransferase-System bei Strep. salivarius

Kanapka und Hamilton[78] wiesen für die im Speichel als häufigste Streptokokkenart vorkommenden Strep. salivarius bei "toluolbehandelten" Zellen eine Aktivität für 2-Desoxyglukose als Glukoseanalogon nach. Der Umsatz betrug in Gegenwart von 10^{-3}m PEP 60% des eingesetzten Substrats bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Bei einem Zusatz von 10^{-2}m NaF war nur eine geringe Aktivität meßbar, ebenso wenn keine weiteren Zusätze oder ATP als Coenzym mit im Ansatz waren. Weitere Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

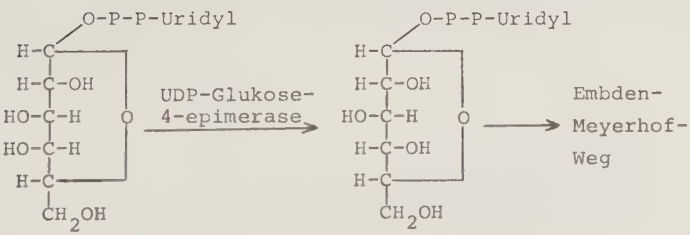
1.6.4. Der Leloir-Weg beim Galaktoseabbau durch Streptokokken der Gruppe H

Bei vielen Organismen, wie etwa E. coli[79] oder Hefen[80], wird Galaktose dadurch abgebaut, daß sie zu Glukose über den Leloir-Weg umgewandelt wird. Dieser Stoffwechselweg wurde in neuester Zeit auch für Streptokokken der Gruppe H beschrieben[81].

Der Galaktoseabbau nimmt folgenden Weg:



Galaktose Galaktose-1-P



UDP-Galaktose UDP-Glukose

1.7. Sensitivität für Zuckerphosphate bei Stoffwechselmutanten

Blockiert ein Enzymdefekt den Abbau eines Zuckers, so können sich intrazellulär beträchtliche Mengen eines Zwischenproduktes ansammeln. Manche dieser Intermediären verursachen eine Hemmung des Wachstums oder eine Lyse der Zellen. Zu diesen Verbindungen gehören auch viele Monophosphate von Zuckern und Zuckeralkoholen.

Mutanten von Salmonella typhimurium, die keine oder nur niedere Aktivität an M-1-P-DH besitzen, sind sensitiv für Mannit[82], d.h. M-1-P ist toxisch und verursacht die Einstellung des Wachstums, teilweise auch die Lyse der Zellen. In den Zellen wurden Konzentrationen von 20 mMol M-1-P gemessen. Auch Galaktose verursacht bei S. typhimurium eine Lyse[83]. In E. coli wird durch eine L-α-Glycerinphosphat-Anreicherung[84] das Wachstum gehemmt. Beim gleichen Bakterium bedingt das Fehlen der L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase eine L-Arabinose-Sensitivität[85]. Andere Mutanten von E. coli, bei denen die Phosphoglukoseisomerase und Glukose-6-P-DH[86] nicht vorhanden sind, werden durch G-6-P im Wachstum beeinträchtigt.

1.8. Einfluß von Fluorid

1.8.1. Frühere Arbeiten über den Einfluß von NaF auf intakte Zellen

Die Fluoridhemmung der Glykolyse bei Tieren und Bakterien wurde seit vielen Jahren mit einer Hemmung der

Enolase, die die Umwandlung von 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphoenolpyruvat katalysiert, erklärt. Frühere Untersuchungen[87)] mit rohen Muskelextrakten hatten klar gezeigt, daß dieses Enzym das am meisten fluoridsensitive Enzym im Glykolyseweg war. Warburg und Christian[88)] bestätigten diese Ergebnisse mit gereinigter Enolase aus Muskeln. Sie verwiesen auf die wichtige Rolle von Phosphat und Magnesiumionen, die durch die Bildung eines "inaktiven" Magnesiumfluorophosphatkomplexes, der reversibel anstelle des "aktiven" Magnesiums an das Enzym gebunden wird, die Inhibition verursachen. Dieser Hemmungsmechanismus wurde allgemein anerkannt und von anderen Autoren zur Erklärung der Fluoridwirkung bei weiteren Metalloenzymen angewandt[89)]. Es wurde jedoch auch darauf hingewiesen[90)], daß die Gültigkeit dieser Verallgemeinerung sehr oft fraglich sein kann, da sehr wenige Untersuchungen über die Wirkung von Fluorid in vivo bekannt sind. So konnte in früheren Arbeiten[91)] mit Hefen deutlich gezeigt werden, daß zellfreie Extrakte und getrocknete Zellen viel sensitiver gegen Fluorid sind als intakte Zellen.

Später wurde bei E. coli[22)] gezeigt, daß intakte Zellen nicht fluoridsensitiv sind, während Fluorid im Homogenisat sehr stark hemmt.

1.8.2. Spezielle Modelle über den Einfluß von NaF auf den Transport

1.8.2.1. Effekt von NaF auf das PEP-abhängige Phosphotransferase-System bei E. coli

Kaback hat sich intensiv mit dem Einfluß von NaF auf das PTS bei E. coli beschäftigt und zwei interessante Theorien aufgestellt. Einmal nimmt er an[93] daß die Enolase membrangebunden ist; denn bei seinen Studien mit isolierten Membranvesikeln konnte er einen stimulierenden Effekt durch 2-P-Glycerinsäure auf die α-Methylglukoseaufnahme messen. Durch die membrangebundene Enolase soll PEP produziert werden. Die Aufnahme ist durch 10^{-2}m NaF selektiv hemmbar, auch in Gegenwart von 2-P-Glycerinsäure. Nach weiteren Arbeiten[9] ist ein direkter Einfluß von NaF auf die Membran wahrscheinlicher. Für die "vectorial phosphorylation", die durch das PTS durchgeführt wird, konnte gezeigt werden, daß sie durch NaF verändert wird. Die Bildung des Zuckerphosphats geschieht unter dem Einfluß von Fluorid an der Außenseite der Membran und nicht mehr an der Innenseite. NaF ändert also den Prozeß der Translokation durch die Membran und hat keinen oder nur geringen Einfluß auf die Phosphorylierungsreaktion selbst.

1.8.2.2. Effekt von NaF auf das PEP-abhängige Glukose-Phosphotransferase-System bei Strep. salivarius

Hamilton und Kanapka[78] verglichen die intrazellulären Konzentrationen von Glukose-6-P, 2-P-Glycerinsäure, PEP und Pyruvat in intakten Zellen von Strep.

salivarius, die Glukose in Gegenwart oder Abwesenheit von NaF fermentierten. Sie fanden, daß die Zugabe von $2,4 \times 10^{-3}$m NaF die Zuckeraufnahme abstoppte, die G-6-P-Konzentration sofort abnahm und die Enolase gehemmt wurde. Durch den Nachweis, daß für den Glukosetransport ein PEP-abhängiges Phosphotransferase-System verantwortlich war, war eine mögliche Verknüpfung zwischen den beiden fluoridsensitiven Punkten des Metabolismus in folgender Weise vorstellbar[78]. Die Fluoridhemmung der Enolase verursacht die Hemmung des Glukosetransports, da nur eine verringerte Menge an PEP für die Phosphorylierung verfügbar ist. Dieser Zusammenhang erklärt auch die frühere Beobachtung von Hamilton[94], daß Fluorid die Polyglukosesynthese, die exogene Glukose benötigt, stark hemmt. Der endogene Abbau von Polyglukose ist viel weniger sensitiv.

1.9. Ziel dieser Arbeit

Der wichtigste Teil dieser Arbeit ist die Aufklärung der Aufnahme und Phosphorylierung der Hexite Sorbit und Mannit durch einen kariogenen Stamm von Strep. mutans.

Um Aussagen darüber machen zu können, ob diese Ergebnisse für die wichtigsten anderen Zucker zutreffen, wurden einige vergleichende Untersuchungen mit Glukose, Fruktose, Galaktose, Laktose und Saccharose durchgeführt.

Diese Arbeit umfaßt daher folgende Untersuchungen:

1) Feststellung der Bedingungen, unter denen bei dem Stamm 275 , der von Gehring[8] aus Zahnplaques isoliert worden war, eine Substrataufnahme und Phosphorylierung stattfindet, wie der Transport und der Stoffwechsel durch Inhibitoren beeinflußt wird und wie sich die Zugabe eines Substrats vor oder während der Inkubation auswirkt.

2) Der Einsatz nichtfermentierbarer Zucker-Analoga sollte es ermöglichen, den Transport vom Stoffwechsel zu trennen. Dadurch könnte der Transport genauer charakterisiert werden.

3) Eine andere Möglichkeit, den Transport und Stoffwechsel unabhängig voneinander zu studieren, bietet die Untersuchung von Mutanten. Deshalb sollten Mutanten erzeugt werden, die einen Block im Stoffwechsel als Folge eines Enzymdefekts aufweisen oder die unfähig sind, überhaupt Substrat aufzunehmen.

2. Material und Methoden

2.1. Stämme

Untersucht wurden Stämme von Streptococcus mutans, die von Gehring[8)] aus Zahnplaques isoliert und charakterisiert und uns zur Verfügung gestellt wurden.

Die Stämme 249 und 275 können u.a. die Zucker und Zuckeralkohole D-Glukose, D-Galaktose, D-Fruktose, D-Mannose, Saccharose, Laktose, D-Mannit, D-Sorbit verwerten, wobei Säuren als Endprodukte von den Bakterien ins Medium abgegeben werden.

Die Stämme 290, 407 und 431 wurden von Gehring als Sorbit-negativ (Sorbit$^-$) charakterisiert, da sie im Phenolrot-Flüssigmedium mit Sorbit als Kohlenstoffquelle auch nach fünftägiger Bebrütung keinen Farbumschlag verursachen konnten.

Alle Stämme bilden auf 5% Saccharose-Phenolrotmedium ein Polysaccharid von gallertartiger Beschaffenheit mit dünnflüssigen Absonderungen.

Falls keine anderen Angaben aufgeführt sind, wurden die Untersuchungen am Stamm 275 durchgeführt. Für alle Mutanten war auch dieser Stamm 275 der Wildtyp.

2.2. Chemikalien

D-Sorbit, D-Mannit, Xylit, D-Glukose, D-Fruktose, D-Galaktose, D-Arabit, D-Arabinose, D-Mannose,

D-Dulcit, m-Inosit, m-Erythrit, L-Sorbose, Laktose, Saccharose, α-Methyl-D-Glukose (alle Merck);

Ribit (Adonit); 2-Desoxy-D-Glukose (Serva);

3-O-Methyl-D-Glukose, ß-Methylthiogalaktosid (Calbiochem.).

2-Desoxy-D-Sorbit und 3-O-Methyl-D-Sorbit wurden durch Reduktion mit $NaBH_4$[95] erhalten.

Fruktose-Cl4, Glukose-Cl4, Galaktose-Cl4, Laktose-1-Cl4, Methyl-(α-D-Glukose-Cl4), 3-O-Methyl-(D-Glukose-Cl4), 2-Desoxy-(D-Glukose-1-Cl4), Xylit-Cl4 (alle Amersham).

D-Sorbit-Cl4, D-Mannit-1-Cl4, Arabinose-1-Cl4, ß-Methyl-Cl4-D-Thiogalaktosid, Saccharose-Cl4 (alle NEN).

2-Desoxy-(D-Sorbit-1-Cl4), 3-O-Methyl-(D-Sorbit-Cl4), Arabit-1-Cl4 wurden nach Zumischen von unmarkierten Trägersubstanzen aus den entsprechenden Glukoseverbindungen bzw. Arabinose durch $NaBH_4$-Reduktion[95] hergestellt.

Alle Phosphate lagen als Na-Salze vor:

Fruktose-6-Phosphat (F-6-P), Fruktose-1-Phosphat (F-1-P), Fruktose-1,6-diphosphat (F-1,6-P_2), Phosphoenolpyruvat (PEP), Adenosin-triphosphat (ATP) (alle Boehringer, Mannheim);

Glukose-1-Phosphat (G-1-P), Glukose-6-Phosphat (G-6-P), DL-2-Phosphoglycerinsäure (2-P-glycerat) (alle Serva).

Alle anderen Chemikalien waren vom höchsten käuflichen Reinheitsgrad.

2.3. Kulturmedien

2.3.1. Stammerhaltungskulturen

Die Stammerhaltung wurde in 12 ml Schraubkappengläser als Stichkultur durchgeführt.

Das Medium enthielt in 1000 ml:

Bacto-Casein (Difco)	15,0 g
Yeast-Extrakt (Difco)	5,0 g
NaCl p.a. (Merck)	2,5 g
Glukose f. biochem. Zwecke (Merck)	10,0 g
L-Cystein (Difco)	0,5 g
Na-Thioglycolat (Difco)	0,5 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g

Die Kulturen wurden routinemäßig alle 14 Tage überimpft und bei 4° C aufbewahrt.

2.3.2. Flüssigmedien

Zur Anzucht der Bakterien wurden 100 ml Schraubverschlußflaschen, in denen weitgehend anaerobe Bedingungen herrschten, mit folgenden Medien verwendet:

Bacto-Tryptose (Difco)	20,0 g
Yeast-Extrakt (Difco)	4,0 g
L-Cystein (Difco)	50,0 mg
Na_2HPO_4 (Merck)	2,5 g
NaH_2PO_4 (Merck)	0,6 g
NaCl (Merck)	2,5 g

Als Kohlenstoffquelle wurden Zucker und Zuckeralkohole p.a. oder für biochem. Zwecke (Merck) je 10g/l zuge-

setzt. Die Zucker wurden getrennt vom übrigen Medium sterilisiert.

Zuckerfreies Medium: wie oben, ohne Zuckerzusatz.

2.4. Vorbereitung der Bakterien für den Versuch:

Die Bakterien wurden in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet (mittlere log-Phase, O.D. = 0,4 - 0,6; späte log-Phase, O.D. = 0,6 - 0,8; stationäre Phase, O.D. > 0,9). Nach der Zentrifugation bei 3000 g wurden die Bakterien mit physiol. Kochsalzlösung zweimal gewaschen und in zuckerfreiem Medium resuspendiert. Die Einstellung einer konstanten Zellmenge erfolgte durch Messung der Transmission bei 575 mm gegen zuckerfreies Medium an einem Zeiss-Photometer PMQ 2.

3 ml einer Zellsuspension der O.D. = 1 entsprechen 1 mg Trockengewicht.

2.5. Bestimmung der Aufnahmerate

Die Bakterien wurden in einem Flüssigmedium, das 1% Zucker oder Zuckeralkohol enthielt, bis zu einer O.D. ~ 0,5 - 0,6 (entspricht der mittl. log-Phase) angezogen. Auf eine Anzucht in einem Glukosemedium wurde - wegen der zu erwartenden katabolischen Repression - verzichtet. Nach dem zweimaligen Waschen in physiol. NaCl-Lösung wurde eine Bakteriensuspension der O.D. = 1 mit zuckerfreiem Medium eingestellt.

30 ml Versuchsansatz enthielten:

Zellen (333 µg Trockengewicht/ml)
Chloramphenicol (CAP) 33 µg/ml

Der Start erfolgte durch die Zugabe der radioaktiven Substrate:

Sorbit-C14 oder Mannit-1-C14 ($9x10^{-4}$m; 0,027 mCi/mMol) oder bei Versuchen mit niederen Konzentrationen: Sorbit-C14 (10^{-7}m; 7 mCi/mMol), Mannit-1-C14 ($5x10^{-8}$m; 16,8 mCi/mMol); Xylit-C14 (10^{-4}m; 3,3 mCi/mMol), 2-Desoxy-(Sorbit-1-C14) ($2x10^{-4}$m; 1 mCi/mMol), 3-O-Methyl-(Sorbit-C14) (10^{-4}m; 1 mCi/mMol); Glukose-C14, 3-O-Methyl-(Glukose-C14), Methyl-(α-Glukose-C14) (alle $9x10^{-4}$m; 0,027 mCi/mMol).

Die Probenentnahme von je 3 ml erfolgte nach 1,2, 4, 6, 8, 10, 20 und 30 Minuten. Die Zellen wurden über ein Cellulose-Membranfilter (0,6 µ Porengröße, Millipore) abgetrennt und rasch mit 2 ml kaltem, zuckerfreiem Medium gewaschen. Nach dem Trocknen bei 90° C wurden die Filter in Toluol-Szintillator (5 g PPO + 50 mg POPOP pro Liter Toluol) überführt und die Aktivität als Maß der aufgenommenen Substratmenge in einem Flüssigszintillationszähler (LSC) (Tricarb/Packard) bestimmt.

2.6. Extraktion der Zellen mit Lösungsmitteln

Als ein gut geeignetes Verfahren, die Zellen nach der Inkubation zu zerstören, erwies sich die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, da diese leicht vor der Chromatographie abgedampft werden konnten. Durch die Lösungsmittel wird die Zellmembran, die einen

großen Anteil an Phospholipiden enthält, teilweise aufgelöst. Dadurch können Moleküle aus dem Cytoplasma nach außen treten.

Die Zellen wurden in Ansätzen wie unter 2.5. beschrieben, inkubiert. Die eingesetzten Zucker hatten folgende Konzentrationen und spez. Aktivitäten:

Sorbit-C14, Mannit-1-C14 (je 5×10^{-4}m; 0,162 mCi/mMol), Xylit-C14 (10^{-4}m; 3,3 mCi/mMol), 2-Desoxy-(Sorbit-1-C14) (2×10^{-4}m; 1 mCi/mMol), 3-O-Methyl-(Sorbit-C14) (10^{-4}m; 1 mCi/mMol), 3-O-Methyl-(Glukose-C14) und Methyl-(α-Glukose-C14) (je $1{,}8 \times 10^{-3}$m; 0,162 mCi/mMol).

Die Inkubation wurde durch Abtrennung der Zellen an Membranfiltern beendet, die Bakterien auf den Filtern rasch gewaschen und sofort in ein 50 ml Kölbchen mit 5 ml n-Butanol/Aceton/H_2O = 5:5:90 gelegt. Nach 10-minutigem Erhitzen am Rückflußkühler im siedenden Wasserbad wurde die Suspension nochmals über ein Cellulose-Membranfilter (0,6 μ Millipore) abfiltriert. Das Filtrat wurde an einem Rotationsverdampfer bei 30° C eingedampft und mit 200 μl H_2O wieder aufgenommen.

2.7. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie war das wichtigste Hilfsmittel, um schnell umfassende Aussagen über den intrazellulären Zustand eines Substrats nach dem Transport geben zu können.

Dazu wurden 5 μl des in 200 μl Wasser aufgenommenen

Extraktes auf eine DC-Cellulose-Fertigplatte (Merck) aufgetragen. Eine gute Trennung , vor allem der Phosphatderivate, wurde durch die Entwicklung mit dem von Fischer[96)] vorgeschlagenen Laufmittel i-Propanol/25% NH_3/H_2O = 6:3:1 erreicht, die noch verbessert werden konnte, wenn die Entwicklung wiederholt wurde. Die einzelnen Metaboliten konnten durch mehrtägigen Kontakt der Platte mit einem Röntgenfilm (OSRAY T4, Agfa-Gevaert) nachgewiesen werden.

2.8. Identifizierung der Metaboliten

2.8.1. Färbemethoden

2.8.1.1. Nachweis von Phosphatestern

Die Platten wurden mit Hanes Reagenz besprüht, 3-4 Minuten bei 85° C im Trockenschrank erhitzt und dann mit UV-Licht von ~265 nm bestrahlt. Nach einigen Minuten zeigten sich phosphathaltige Verbindungen als blaue Flecken auf gelben Untergrund.
Hanes Reagenz: 5 ml 60% $HClO_4$; 10 ml 1nHCl, 25 ml 4% Ammoniummolybdat, mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

2.8.1.2. Nachweis von 2-Desoxy-D-Sorbit und seinen Derivaten

Zur Oxidation wurden die Platten mit 0,1 prozentiger Perjodsäurelösung besprüht und nach 5 Minuten die überschüssige Perjodsäure mittels 0,5 prozentiger Natriummetaarsenitlösung (in 0,5 nHCl) zerstört.

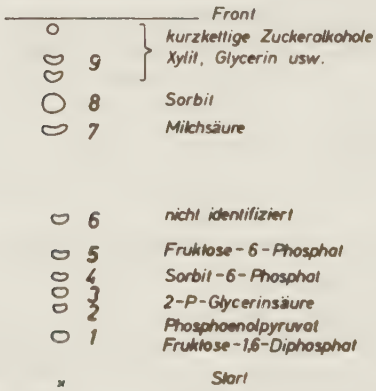
Abb. 1: Beispiel eines Dünnschichtchromatogramms

5 µl eines Zellextraktes (siehe Kap. 2.6.) wurden auf eine DC-Cellulose-Fertigplatte (Merck) aufgetragen.

Laufmittel: i-Propanol/25% NH_3/H_2O = 6:3:1

Die Entwicklung wurde nach Zwischentrocknung wiederholt.

Laufstrecke: ca. 14 cm
Laufzeit: 4-6 Stunden
Nachweis der Metaboliten: mehrtägiger Kontakt der Platte mit Röntgenfilm (OSRAY T4, Agfa-Gevaert).
Identifizierung der Metaboliten wie in Kap. 2.8. beschrieben.



Allgemeine Zuordnung der Metaboliten des Zuckerstoffwechsels

Um die Autoradiogramme übersichtlicher zu gestalten und die Zuordnung zu erleichtern, wurden für die gleichen Metaboliten in den einzelnen Autoradiogrammen immer dieselben Ziffern angewandt.
Im Versuch eingesetztes Substrat erhielt die Ziffer 8, das Monophosphat des eingesetzten Substrats die Ziffer 4. Lediglich für Fruktose-6-P wurde die Ziffer 5 festgesetzt.

Die Ziffern bedeuten:

1 : Fruktose-1,6-diphosphat
2 : Phosphoenolpyruvat
3 : 2-Phosphoglycerinsäure
4 : Monophosphat des eingesetzten Substrats (Sorbit-6-P, Mannit-1-P, Xylit-P usw.)

Ausnahme: Fruktose-6-P = 5

5 : Fruktose-6-P
6 : eine Substanz, die sehr oft nachgewiesen werden konnte, aber nicht identifizierbar war
7 : Milchsäure
8 : eingesetztes Substrat (z.B. Sorbit, Mannit, Xylit usw.)
9 : kurzkettige Polyole: Xylit, Glycerin usw.
10 : anionisches Derivat beim Laktoseabbau, wahrscheinlich Laktosephosphat

Nach dem Besprühen mit 3,5 prozentiger Diaminobenzoesäurelösung-Reagenz tritt die charakteristische Grüngelbfluoreszenz bereits bei Raumtemperatur auf.

Sprühlösung: 1 g 3,5-Diaminobenzoesäurehydrochlorid in 25 ml 80% H_3PO_4 gelöst und mit 60 ml H_2O verdünnt.

2.8.2. Identifizierung durch Enzymtests

Die unbekannten Flecken wurden auf Grund des Autoradiogramms aus der DC-Cellulose-Platte ausgekratzt und die Substanzen mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde eingeengt und für enzymatische Bestimmungen verwendet.

Alle Arbeitsvorschriften wurden einem Standardwerk[98)] der Enzymbestimmung entnommen. Es soll daher nur angegeben werden, welche Substanz mit welcher Methode identifiziert wurde.

Glukose-6-P und Fruktose-6-P	S. 157
Fruktose-1,6-diphosphat	S. 146
D-2-Phosphoglycerinsäure und PEP	S. 224

2.8.3. Markierung der Zuckerphosphate mit ^{32}P

Ansatz: Sterile Lösungen von

4 ml zucker- und phosphatfreiem Medium
0,5 ml TRIS/HCl-Puffer (p_H = 7,0)
(2,4 g TRIS in 180 ml $^n/10$ HCl)
0,5 ml einer 10%-Zuckerlösung für die induziert werden sollte

0,001 ml H_3PO_4 (80%)
0,006 ml NH_3 (25%)
10 µCi $H_3{}^{32}PO_4$ wurden gemischt und mit einer Kultur von St. 275 beimpft. Sobald die Bakterien die mittlere log-Phase erreichten, wurden sie abzentrifugiert, mit physiolog.NaCl gewaschen und in 5 ml zuckerfreiem Medium resuspendiert.

1. Zu einer 2,5 ml Probe wurde soviel einer Lösung des unmarkierten Zuckers, der auch für die Anzucht verwendet worden war, zugegeben, daß eine Konzentration von $5x10^{-4}$m erreicht wurde. Unmittelbar nach dem Mischen und nach 30 Minuten wurden Proben von je 1 ml entnommen.

2. Zu einer weiteren 2,5 ml Probe wurde der entsprechende C14-markierte Zucker ($5x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol) zugesetzt und ebenfalls nach dem Mischen und nach 30 Minuten erfolgten Probenentnahmen.

Die Proben wurden extrahiert und einer Dünnschichtchromatographie unterworfen.

Die erste Versuchsreihe wurde mittels Hanes Reagenz (Kap. 2.8.1.1.) angefärbt, von der zweiten Versuchsreihe wurden Autoradiographien erstellt.

Die erste Versuchsreihe zeigte anorganische Phosphate und Zuckerphosphate an, in der zweiten Versuchsreihe waren auf Grund der Doppelmarkierung alle Phosphate und alle anderen Metaboliten nachweisbar. Eine einfache Trennung zwischen ^{32}P und ^{14}C ist dadurch möglich, daß eine Glasplatte von 2mm Dicke zwischen

die Dünnschichtplatte und den Röntgenfilm gelegt wird. Nur ^{32}P verursacht eine Belichtung auf dem Röntgenfilm, ^{14}C-Strahlung wird absorbiert.

2.8.4. Spaltung von Zuckerphosphaten mit saurer Phosphatase

Ein weiterer Test für die Identifizierung von unbekannten Derivaten, bei denen vermutet wurde, daß es sich um Phosphate handelte, war die Behandlung mit saurer Phosphatase.

Ansatz:

Saure Phosphatase aus Weizenkeimen (Boehringer) 5 mg/ml; 0,1 m Äthylendiamin-Citrat-Puffer (p_H = 5,3); unbekanntes radioaktiv markiertes Derivat, aus der Dünnschichtplatte ausgekratzt und eluiert. Inkubationsdauer: 5 Stunden.

Nach der Behandlung wurde der vermutete Zuckeranteil (unmarkiert) als Trägersubstanz zugesetzt und eine Autoradiographie durchgeführt. Konnte nach der Phosphatasespaltung das Derivat nicht mehr nachgewiesen werden und war ein radioaktiver Zucker feststellbar, so wurde der Test als positiv angesehen.

2.9. Test des Phosphat-Donators der Phosphorylierungsreaktion

2.9.1. Test mit toluolbehandelten Zellen

Die Toluolbehandlung ist ein Standardverfahren, um die Zellmembran soweit aufzulösen, daß das Substrat rasch

an die Enzyme des Cytoplasmas oder an membrangebundene Enzyme gelangt.

Ansatz:

0,8 ml enthielten: Zellen (1,06 mg Trockengewicht), $MgCl_2$ (10^{-3}m), 10 µl Toluol und die C14-markierten Substrate.

Konzentrationen und spez. Aktivitäten:

Sorbit-C14, Mannit-1-C14, Glukose-C14, Fruktose-C14, Galaktose-C14 (alle $5x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol), Xylit-C14 (10^{-4}m; 3,3 mCi/mMol), 2-Desoxy-(Sorbit-1-C14) und 3-O-Methyl-(Sorbit-C14) (10^{-4}m; 1 mCi/mMol), ß-Methyl-C14-D-Thiogalaktosid ($5x10^{-4}$m; 1mCi/mMol), Arabit-1-C14 (10^{-4}m; 1 mCi/mMol).

Weitere Zusätze in verschiedenen Ansätzen:

10^{-2}m NaF und PEP, G-6-P, F-1-P, F-6-P, 2-P-Glycerinsäure, ATP (alle 10^{-3}m).

Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten bei 37° C. Dann wurden die Proben zur Abstoppung der Reaktion im kochenden Wasserbad 10 Minuten erhitzt. Eine zellfreie Fraktion wurde durch Filtration über Membranfilter erreicht. Dieses Filtrat wurde eingeengt. Im Filtrat waren nach der DC-Trennung auch in Abwesenheit von NaF neben dem unveränderten Substrat nur Phosphate (Monophosphat und 2-P-Glycerinsäure) nachweisbar. Deshalb empfahl sich folgende Methode, die auf einfache Weise quantitative Aussagen erlaubt. Von dem konzentrierten Filtrat wurden 50 µl direkt in Dioxan-Szint gegeben und mit dieser Probe die Gesamtaktivität = Substrat und anionische Produkte bestimmt.

Bestimmung des Umsatzes in Gegenwart von Phosphat-Donatoren

Ansatz:

Toluolbehandelte Zellen + Substrat

↓ Membranfiltration

Filtrat:

Substrat + phosphorylierte Produkte

↓ Vakuumeinengung

50 µl in 10 ml Dioxan-Szint

↓ (Gesamtaktivität)

LSC : Zählausbeute 80%

50 µl auf DEAE-Ionenaustauscher-Cellulose-Filterpapier

↓ Waschen des Filtrats mit 200 ml dest. H_2O

Filter trocknen, in 10 ml Toluol-Szint

(anionischer Anteil der Radioaktivität)

↓

LSC : Zählausbeute 52,5%

Der anionische Anteil wurde durch eine modifizierte Form der Methode von Newsholme[99] et al. gefunden. 50 µl des Filtrats wurden auf ein DEAE-Ionenaustauscher-Cellulose-Filter (DE 83 Whatman; 23 mm Durchmesser) möglichst zentral aufgebracht. Dabei war von Vorteil, die Filter auf Trockeneis zu legen, damit der Tropfen in der Mitte festfror. Beim langsamen Auftauen verteilte sich die Lösung gleichmäßig. Nach dem Eintrocknen bei Raumtemperatur wurden die Filter auf die Filtrationsplatte eines Pyrex-Mikroanalyse-Filtrationsgerätes (Millipore) gelegt und ohne weitere Befestigung durch den Filteraufsatz mit langsamer Durchflußgeschwindigkeit mit etwa 200 ml destilliertem Wasser gewaschen. Neutrale Zucker wurden dabei weggespült (99%), während etwa 97% des anionischen Anteils zurückgehalten wurden. Das getrocknete Filter wurde zur Radioaktivitätsmessung in Toluol-Szint gelegt. Aus den beiden im LSC gemessenen Werten der Gesamtaktivität und des anionischen Anteils wurde der Umsatz berechnet.

2.9.2. Phosphorylierung im "Rohextrakt"

Der "Rohextrakt" wurde nach einer der Methoden hergestellt, die im nächsten Kapitel beschrieben sind.

Der Versuchsansatz wurde, wie in 2.9.1. beschrieben, inkubiert und aufgearbeitet, nur wurde statt der "toluolbehandelten" Zellen der "Rohextrakt" zugesetzt. Sollte der Ansatz mit der "Partikelfraktion" ergänzt werden, so wurde der im Puffer resuspendierte Bodensatz im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

2.10. Zellaufschlußverfahren

2.10.1. Ultraschallbehandlung

Die gewaschenen Zellen wurden in 0,05 m Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4-Puffer (p_H = 7,6) insgesamt 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Beschallung erfolgte unter Eiskühlung und mit Pausen, so daß die Temperatur der Suspension nicht über 10° C anstieg. Anschließend wurden die zerstörten Zellen 30 Minuten lang bei 4° C einer Zentrifugation mit 25000 g unterworfen. Der Überstand wurde als "Rohextrakt" bezeichnet. Zur Gewinnung der "Partikelfraktion" wurde der Bodensatz im gleichen Volumen Phosphatpuffer, das vor der Ultraschallbehandlung zugesetzt worden war, resuspendiert.

2.10.2. Gefrierschockbehandlung

Statt der Ultraschallbehandlung wurden die Bakterien nach der Resuspendierung im Phosphatpuffer mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut. Dieses Verfahren führt unter sehr schonenden Bedingungen zu einer weitgehenden Zerstörung der Bakterien und ist in seiner Wirksamkeit vergleichbar mit der Ultraschallbehandlung , wie Messungen des freigesetzten löslichen Proteins (nach der Methode von Warburg und Christian[88]) bestätigen.

2.10.3. Behandlung im Homogenisator

Für die Bestimmung der Hexit-Dehydrogenasen wurden die Zellen nach dem folgenden Verfahren aufgeschlos-

sen. Die Zellen wurden zusammen mit 1,5 g Aluminiumoxid (Hersteller: FPT Martiuswerke, 515 Bergheim/Erfurt) und 1 ml Puffer 5 Minuten lang im Homogenisator nach Potter-Elvehjen unter Eiskühlung zerrieben und anschließend mit weiteren 9 ml Puffer aufgenommen. Der Puffer für Dehydrogenaseversuche enthielt:

m/10 $NaHCO_3$; m/1000 L-Cystein x HCl; p_H = 9,0

2.11. Einfluß von Stoffwechselinhibitoren und Proteinreagenzien auf Transport und Stoffwechsel

2.11.1. Einfluß verschiedener NaF-Konzentrationen

Ansätze und Aufarbeitung wie bei 2.5. (Bestimmung der Aufnahmerate), 2.6. (Extraktion der Zellen mit Lösungsmitteln) und 2.7. (Dünnschichtchromatographie).

Die Zellen wurden mit 10^{-1}, $5x10^{-2}$, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}m NaF 15 Minuten vor Zugabe des radioaktiven Substrats vorinkubiert.

2.11.2. Einfluß anderer Stoffwechselinhibitoren und Proteinreagenzien

Die Bakterien wurden in einem 1%-igen Mannit-Medium angezogen, in der log-Phase geerntet, gewaschen und in zuckerfreiem Medium resuspendiert. Vor Versuchsbeginn wurde mit den Chemikalien mindestens 30 Minuten vorinkubiert. Der Start erfolgte durch Zugabe

des Substrats Mannit-1-C14 ($5x10^{-8}$m; 16,8 mCi/mMol).

Ansatz:

3 ml enthielten 1 mg Zellen (Trockengewicht), 100 µg CAP und die Inhibitoren Natriumfluorid (10^{-2}m), 2,4-Dinitrophenol ($2x10^{-3}$m), Natriumazid ($3x10^{-3}$m), Jodacetat und Jodacetamid (je $2x10^{-3}$m), p-Chlormercuribenzoesäure, Na-Salz (10^{-4}m).

Die Proben wurden nach 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 und 30 Minuten entnommen, abfiltriert, gewaschen und im LSC die aufgenommene Aktivität bestimmt.

2.12. Kompetitive Hemmung der Aufnahme

Der 3 ml Ansatz enthielt:

Zellen 1 mg, CAP 100 µg, unmarkierter Zucker ($5x10^{-2}$m) und radioaktive Testzucker.

Konzentrationen und spez. Aktivitäten der radioaktiven Testzucker:

Sorbit-C14, Mannit-1-C14, Fruktose-C14, Galaktose-C14 (alle $5x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol), 2-Desoxy-(Sorbit-1-C14) ($2x10^{-4}$m; 1 mCi/mMol), Methyl-(α-Glukose-C14) ($5x10^{-5}$m; 3,8 mCi/mMol).

Die Aufnahme wurde nach einer 20-minutigen Inkubation durch Filtration abgestoppt. Die Bakterien wurden mit 5 ml kaltem, zuckerfreiem Medium nachgewaschen. Die Menge an radioaktiven Zucker, die in Abwesenheit von nicht radioaktiven Zuckern aufgenommen wurde, wurde

als Standard-Aufnahme (100%) festgesetzt und die Aufnahme in Gegenwart eines unmarkierten Zuckers als Prozent von diesem Wert berechnet.

2.13. Rücktransport durch Zugabe eines zweiten Substrats

4 ml Ansätze enthielten:

Sorbit-, Mannit- bzw. Glukose-Medium-induzierte Zellen (1,32 mg/ml)

Chloramphenicol (33 µg/ml)

und die nicht abbaufähigen Hexit- bzw. Glukose-Analoga

2-Desoxy-(Sorbit-1-C14) ($2x10^{-4}$m; 1 mCi/mMol),
Xylit-C14 (10^{-4}m; 1 mCi/mMol),
Methyl-(α-Glukose-C14) ($5x10^{-5}$m; 3,8 mCi/mMol).

Bei Hexit-Analoga wurden Proben von je 0,4 ml nach 10, 20 und 30 Minuten entnommen. Nach 30 Minuten wurden rasch die nichtmarkierten zweiten Substrate (Mannit, Sorbit, Galaktose, Dulcit, Glukose, 2-Desoxysorbit; alle $5x10^{-3}$m) zum Versuchsansatz zugespritzt und weitere Proben wurden dann nach 32, 34, 36, 38, 40 und 45 Minuten zur Filtration gebracht.

Versuche mit α-Methylglukose wurden analog durchgeführt.

Die Bakterien wurden auf den Filtern gewaschen und in T-Szint überführt. Zur Berechnung des Zellwassers wurden die Werte, die Kashket und Wilson[77] bei Strep. lactis ermittelt hatten, zugrundegelegt. Danach entspricht die im Versuch eingesetzte Bakterienmenge von 0,53 mg Trockengewicht einem Zellwassergehalt von 0,77 µl. Wurde der intrazelluläre Zustand des aufgenommenen Substrats untersucht, so wurden die Zellen, wie in 2.6. und 2.7. beschrieben, extrahiert und der Extrakt chromatographiert.

2.14. Indikator-Agar-Platten

Als Indikatormedium für die Säurebildung wurde ein Festmedium in Petrischalen verwendet, das im Liter enthielt:

Bacto-Beef (Difco)	1 g
Proteose Pepton Nr. 3 (Difco)	10 g
NaCl p.a. (Merck)	5 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g
Bromkresolpurpur (Merck)	0,04 g
Zucker oder Polyole (alle Merck)	10 g

Bei einem p_H = 6,8 zeigt dieses Medium eine violette Farbe. Die Erniedrigung des p_H verursacht eine Gelbfärbung. Kolonien, die den angebotenen Zucker oder das Polyol zu Säuren abbauen können, färben sich gelb, nicht säurebildende Kolonien bleiben farblos. Außerdem können sich Kolonien, die nicht fermentieren, auch nicht voll entwickeln. Sie sind zwar winzig, sind auf der Platte aber gut sichtbar.

2.15. Die Mutagenese

2.15.1. Mutation durch UV-Strahlen

Die Bakterien wurden in einem Sorbitmedium angezogen und,sobald sie die log-Phase erreichten, abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden sie in einer solchen Lösung auf eine O.D. = 0,5 eingestellt. Zur Bestrahlung wurden 10 ml in eine sterile Petrischale gegossen und dann wurde die Suspension 1-4 Minuten lang unter Umrühren einer Dosis von 10 erg/mm^2 x sec ausgesetzt. Zur Vermeidung eines "Photo-Repairs", d.h. Ausbessern des DNA-Schadens bevor die Replikation erfolgt, wurde die Bestrahlung bei gelben Licht vorgenommen und anschließend alle Gefäße mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Kleine Mengen der bestrahlten Zellsuspension wurden wieder in ein frisches Sorbitmedium gebracht und die Überlebenden 6 Stunden anwachsen gelassen. Danach wurden Proben mit einer Koloniezahl von 100-300 auf Sorbit-Indikatorplatten ausgespatelt und die Platten unter anaeroben Bedingungen im Anaerob-Topf (Gas-Pack) 3-5 Tage bebrütet.

2.15.2. Mutation mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG)

2.15.2.1. Erzeugung von Sorbit-Mutanten

Die Bakterien wurden in einem Sorbitmedium angezogen und während der log-Phase geerntet, gewaschen und in einem Sorbitmedium resuspendiert. Nach der Zugabe von 2 mg NNMG/10 ml wurden die Zellen 2 Stunden im

Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert. Zum Abstoppen der Behandlung wurde abzentrifugiert und die Zellen wieder in ein frisches Sorbitmedium gebracht. Sobald eine O.D. zwischen 0,2 und 0,4 erreicht worden war, wurde die Behandlung mit dem mutagenen Agens wiederholt.

Als sehr günstig erwies sich eine weitere Wiederholung der Mutagenese. Nach der dritten Behandlung wurde die Zellsuspension, wie im Kapitel 2.16. beschrieben, ausgeplattet.

2.15.2.2. Erzeugung von Mannit-Mutanten

Dazu wurden die Zellen immer in einem Mannitmedium und nicht wie in 2.15.2.1. in einem Sorbitmedium kultiviert. Die Konzentration an NNMG blieb unverändert. Die Inkubationszeit wurde jedoch auf 30 Minuten verkürzt, da bei einer längeren Einwirkung des mutagenen Agens nur eine winzige Überlebensrate festgestellt wurde.

2.16. Isolierung von Mutanten

Nach dreimaliger Behandlung mit NNMG wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und verschiedene Konzentrationen auf Indikatorplatten ausgespatelt und 3 - 5 Tage unter strikt anaeroben Bedingungen (Anaerob-Topf, Gas-Pack) bei 37° C bebrütet. 100 bis 300 Kolonien auf einer Platte erlaubten noch eine deutliche Unterscheidung zwischen säurebildenden und nicht säurebildenden Kolonien. Versuche mittels der

Replika-Technik eine schnellere Auswahl zu treffen, scheiterten daran, daß die nicht fermentierenden Kolonien zu winzig waren. Deshalb wurden solche Kolonien mit einem Zahnstocher auf die Indikatorplatte übertragen. Die ausgestrichenen Kolonien wurden nach der Bebrütung in ein Flüssigmedium gebracht und nach der Vermehrung wieder auf die Indikatorplatte so ausgestrichen, daß sich Einzelkolonien bildeten. Dieses Isolierungsverfahren mußte wiederholt werden, bis alle Kolonien einer Platte eine einheitliche Kolonieform zeigten.

Die Beschreibung der Mutanten wurde auf Grund der folgenden Merkmale mit den Symbolen festgelegt:

++ : Wildtyp - zeigt nach eintägiger Bebrütung eine Gelbfärbung der Platte, nach 3 Tagen haben sich große, zitronengelbe Kolonien ausgebildet;

+ : nach 2-3 Tagen Gelbfärbung der Platte, die Kolonien erreichen erst nach 5-6 Tagen eine mit ++ Kolonien vergleichbare Größe, sind jedoch nicht so intensiv zitronengelb gefärbt;

(+): nach 2-3 Tagen Gelbfärbung der Platte, die Kolonien sind fast weiß, jedoch größer als die der nicht säurebildenden Mutanten;

(-): nach 3-4 Tagen Gelbfärbung der Platte, die Kolonien sind sehr klein und farblos;

- : auch nach 5-tägiger Bebrütung keine Verfärbung der Platte. Auf der Platte bilden sich winzige, farblose Kolonien.

2.17. Biochemische Charakterisierung der Mutanten

2.17.1. Bestimmung der Aufnahmerate und des intrazellulären Zustands des Substrats

Die Mutanten wurden in einem 1%-igen Sorbit-Medium kultiviert. Obwohl sie Sorbit nicht als Kohlenstoffquelle benutzen können, erreichen sie eine O.D. ~ 0,1 bis 0,2. Eine O.D. größer als 0,2 wurde nicht beobachtet, auch wenn die Zellen mehrere Tage inkubiert wurden. Das verwendete Flüssigmedium erlaubt also ein geringes Wachstum, das dann eingestellt wird, wenn alle verwertbaren Komponenten aufgebraucht sind.

1,6 ml Ansätze zur Bestimmung der Aufnahmerate und des intrazellulären Zustands des Substrats enthielten:

Bakterien (1,32 mg/ml), CAP (33 µg/ml) und die radioaktiven Substrate Sorbit-C14, Fruktose-C14, Galaktose-C14 (alle 5×10^{-4} m; 0,162 mCi/mMol). Zwei Proben zu je 0,8 ml wurden nach 30 Minuten entnommen und über Membranfilter die Zellen abgetrennt und gewaschen.

Ein Filter wurde in "Toluol-Szint" überführt und die aufgenommene Aktivität bestimmt. Die auf dem anderen Filter gesammelten Bakterien wurden extrahiert und chromatograhiert, wie in 2.6. und 2.7. beschrieben.

2.17.2. Bestimmung der Aktivität der PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase

Die Aktivität der PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase wurde - wenn möglich - mit Zellen der gleichen

Kultur, wie für die obigen Versuche verwendet, bestimmt. Zu jeweils 0,8 ml Bakterien (1,32 mg/ml) wurde 10 µl Toluol zugesetzt und die Bakterien entweder ohne weitere Zusätze inkubiert oder durch Zugabe von NaF auf eine Konzentration von 10^{-2}m gebracht oder es wurde sowohl NaF (10^{-2}m) als auch PEP (10^{-3}m) hinzugefügt. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 30 Minuten. Die Bestimmung der Phosphatbildungsrate wurde mittels DEAE-Ionenaustauscher, wie in 2.9.1. beschrieben, durchgeführt.

2.17.3. Bestimmung der spez. Aktivität der Sorbit-6-P-DH bzw. Mannit-1-P-DH

Der Rohextrakt wurde , wie in 2.10.3. beschrieben, hergestellt. Sämtliche Enzymaktivitäten wurden bei 25° C gemessen. Die Aktivitätsangabe erfolgt in internationalen Einheiten (1 m U = 10^{-3}µMol Substratumsatz/min.).

Zu den Extinktionsmessungen stand ein Spektralphotometer Zeiss PM Q II zur Verfügung. Die Enzymreaktionen wurden in Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke durchgeführt.

Ein Ansatz enthielt:

Rohextrakt in Puffer:	2,5 ml
NAD^+, freie Säure (Boehringer), 50 µMol/ml:	0,1 ml
Sorbit-6-P bzw. M-1-P (Boehringer), 90 µMol/ml:	0,2 ml

Die Freisetzung der Hexitphosphate aus 100 mg des entsprechenden Bariumsalzes erfolgte durch längeres Verreiben in einer Lösung von 40 mg Na_2SO_4 in 2 ml H_2O und Abzentrifugieren des unlöslichen $BaSO_4$.

Die Dehydrierungen wurden nach Substratzugabe gestartet und die Enzymaktivitäten der Reaktionen

$$\text{Hexitphosphat} + NAD^+ \xrightarrow[p_H = 9]{\text{Dehydrogenase}} \text{Fruktose-6-P} + NADH + H^+$$

aus der Zunahme der NADH-Extinktion bei 340 nm während der ersten 2 Minuten errechnet.

3. Ergebnisse des Hexitstoffwechsels

3.1. Aufnahmeraten

Die Abb. 2 a und b zeigen, daß die Hexite Mannit und Sorbit bei einer Konzentration 9×10^{-4}m ohne log-Phase während der ersten 10 Minuten aufgenommen werden. Nach 20-30 Minuten ist eine Sättigungskurve erreicht, die aus einer gleichschnellen Substrat-Aufnahmerate und Endproduktabgaberate resultiert.

In der Abb. 3 ist der Beweis für eine rasche Aufnahme und einen sofortigen Metabolismus erbracht. Wird dem Medium nur eine geringe Menge an fermentierbarem Substrat zugesetzt, so ist eine Aufnahme in Form einer Radioaktivitätszunahme in den Zellen nachweisbar. Es wäre zu erwarten, daß dieser Kurvenanstieg in ein Plateau übergeht, wenn alles Substrat aus dem Medium in die Zellen transportiert ist. Tatsächlich erreicht die Kurve nach 1-2 Minuten ein Maximum und in den folgenden Minuten ist ein stetiger Radioaktivitätsabfall zu verzeichnen, der etwa 10 Minuten nach Versuchsbeginn einen konstanten Endwert erreicht. Dieser Versuchsablauf kann durch einen Abbau des Substrats einfach erklärt werden. Der Stoffwechsel setzt unmittelbar nach der Substratzugabe ein, ist aber langsamer als die Aufnahme. Ist nach zwei Minuten aller Zucker aus dem Medium aufgenommen, so nimmt auf Grund des Stoffwechsels, der zu einer Ausscheidung von Endprodukten führt, die intrazelluläre Konzentration an Substrat ab. Die Restaktivität nach 10 Minuten ist auf den Einbau von C14-Bruchstücken in das Zellmaterial zurückzuführen.

Der intrazelluläre Zustand des aufgenommenen Substrats wird im folgenden Kapitel noch ausführlicher untersucht werden.

Um den Transport vom anschließenden Metabolismus trennen zu können, wurden nicht fermentierbare Analoga als Substrat eingesetzt. Die größte Aufnahmerate, eine Rate, die auch mit der Hexite vergleichbar ist, wurde mit 2-Desoxysorbit (2-Desoxymannit) gemessen. Da es das C-2 Atom ist, das bei diesem Analogon gegenüber den Hexiten verändert ist, kann dieser Desoxyzuckeralkohol nicht als ein Substrat für die Differenzierung zwischen Sorbit und Mannit eingesetzt werden. Andere Analoga, die z.B. mit den Dehydrogenasen des Hexitstoffwechsels Aktivitäten[63)64)69)] zeigten, sind Arabit und Xylit. Dabei war Xylit dem Mannit ähnlicher, während Arabit und Sorbit häufiger analog reagierten. Jedoch waren bei Strep. mutans die Aufnahmeraten - wie in Abb. 2 c dargestellt - viel geringer. Auch für 3-O-Methylsorbit konnte nur eine sehr kleine Aufnahmerate gemessen werden. Dies sind erste Hinweise dafür, daß es sich um sehr spezifische Reaktionen handelt, bei denen Enzyme beteiligt sein müssen.

Eine weitere Voraussetzung für eine rasche Aufnahme ist, daß die Bakterien durch Anzucht in einem Hexitmedium vorher induziert wurden.

Abb. 2 a - c : Aufnahme von Hexiten und Hexit-Analoga

Die Zellen wurden in einem Hexitmedium induziert, gewaschen und in zuckerfreiem Medium resuspendiert.

3 ml Proben enthielten:

1 mg Zellen (Trockengewicht), 100 µg Chloramphenicol und radioaktive Zucker

Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Proben abfiltriert, gewaschen und die Radioaktivität im LSC gemessen.

Abb. 2 a und 2 b:

2 a: Mannit-Kultur 2 b: Sorbit-Kultur

Kreise: Mannit-1-C14 (9×10^{-4}m; 0,027 mCi/mMol)
Kreuze: Sorbit-C14 (9×10^{-4}m; 0,027 mCi/mMol)
Punkte: in Abb. 2 a: Mannit-1-C14, Zellen in Galaktose angezogen

in Abb. 2 b: Sorbit-C14, Zellen in Galaktose angezogen

Abb. 2 c : Mannit- bzw. Sorbit-Kultur

Kreise: Xylit-C14 (10^{-4}m; 3,3 mCi/mMol)
Kreuze: 2-Desoxysorbit-1-C14 (2×10^{-4}m; 1 mCi/mMol)
Punkte: 3-O-Methyl-(sorbit-C14) (10^{-4}m; 1 mCi/mMol)

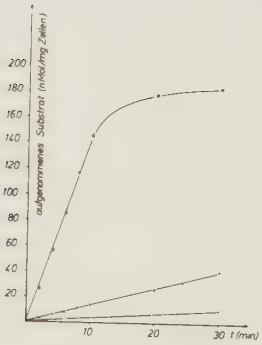


Abb. 2 a

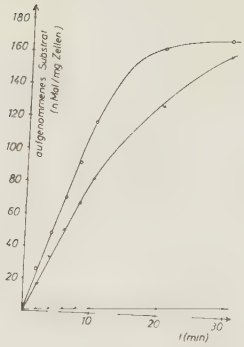


Abb. 2 b

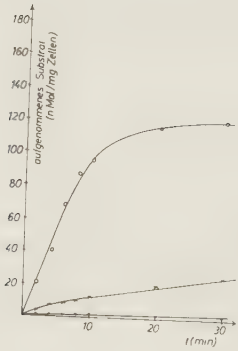


Abb. 2 c

Abb. 3 : Bestimmung der Aufnahmerate bei niederen Hexitkonzentrationen

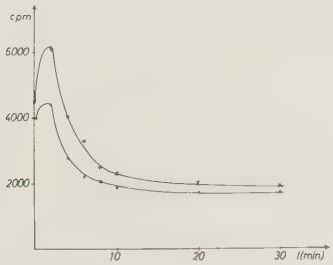
Die Zellen wurden nach Anzucht im Mannitmedium in der mittleren log-Phase geerntet.

3 ml Proben enthielten:

1 mg Zellen (Trockengewicht), 100 µg CAP und radioaktive Hexite

Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen, die Zellen abfiltriert, gewaschen und die Radioaktivität gemessen.

Kreuze: Mannit-1-C14 (5×10^{-8} m; 8 mCi/mMol)
Punkte: Sorbit-C14 (10^{-7} m; 7 mCi/mMol)



Im Sorbitmedium angezogene Zellen können Sorbit und Mannit in vergleichbaren Mengen aufnehmen. Für im Mannitmedium kultivierte Zellen des Stammes 275 konnte für das Substrat Sorbit nur eine geringe Aufnahmerate gemessen werden (25% der Aufnahmerate nach Anzucht im Sorbitmedium). Die Prüfung der wechselseitigen Induktion am Stamm 249 ergab bei diesem Stamm keine unterschiedlichen Aufnahmeraten.

Die Tab. 1 zeigt, daß eine Anzucht in einem Galaktose- oder Ribosemedium keine Induktion eines Transportsystems für Mannit oder Sorbit erzeugt.

Tab. 1 : Induktion der Aufnahme für die Hexite Sorbit und Mannit bei Stamm 275 und 249

Die Stämme wurden bis zur mittleren logarith. Wachstumsphase in einer 1%-igen Zuckerlösung angezogen und mit Sorbit-C14 oder Mannit-1-C14 der Konzentration 5×10^{-4}m und spez. Aktivität 0,027 mCi/mMol 30 Minuten inkubiert.

Stamm	275		249	
Substrat / Anzucht in	Mannit	Sorbit	Mannit	Sorbit
Sorbit	+	+	+	+
Mannit	+	(+)	+	+
Galaktose	0	0	—	—
Ribose	0	0	—	—

+ : Induktion nach Anzucht
0 : keine Induktion
— : nicht getestet

Abb. 4 : Intrazellulärer Zustand der aufgenommenen Substrate

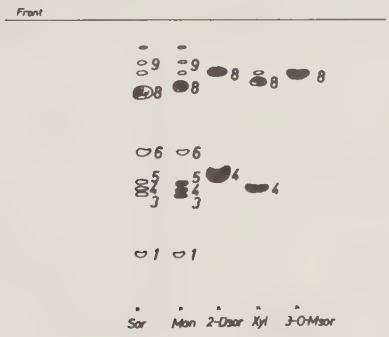
Die Zellen wurden in einem 1%-igen Sorbit- oder Mannitmedium angezogen und mit den angegebenen radioaktiven Zuckern 30 Minuten inkubiert. Die durch Filtration abgetrennten Zellen wurden - wie in 2.6. und 2.7. beschrieben - extrahiert und chromatographiert.

Konzentrationen und Aktivitäten:

Mannit-1-C14, Sorbit-C14 (je 5×10^{-4}m; 0,162 mCi/mMol), Xylit-C14 (10^{-4}m; 3,3 mCi/mMol), 2-Desoxysorbit-C14 und 3-O-Methyl-(Sorbit-C14) (10^{-4}m; 1 mCi/mMol)

Belichtungszeit: 7 Tage

Zuordnung der Intermediäre S. 43



3.2. Intrazellulärer Zustand der aufgenommenen Substrate

Wurden die Zellen mit den verwertbaren Hexiten inkubiert, so konnte eine Reihe von Metaboliten mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. Die Abb. 4 zeigt ein Autoradiogramm für die Hexite und ihre Analoga nach einer 30-minutigen Inkubation. Als die wichtigsten Intermediären wurden F-1,6-P_2, 2-P-Glycerinsäure, die Monophosphate der Zucker, Milchsäure und kurzkettige Zuckeralkohole identifiziert.

Der Einsatz der Zuckeranaloga kann Aufschluß darüber geben, ob die Substrate unverändert in das Cytoplasma gelangen können oder ob an den Transport bereits eine Phosphorylierung gekoppelt ist. 2-Desoxysorbit und Xylit waren größtenteils zu Phosphaten umgesetzt. Daß es sich bei diesen Derivaten tatsächlich um Phosphate handelt, konnte durch Markierungsversuche mit ^{32}P und auch durch Spaltung mit saurer Phosphatase bewiesen werden.

3.3. Untersuchung des Phosphat-Donators der Phosphorylierung

Nachdem für die meisten Zuckeranaloga in intakten Zellen eine Phosphorylierung nachgewiesen worden war und eine Sorbit-6-P- bzw. Mannit-1-P-Dehydrogenase-Aktivität aufgefunden werden konnte, war es

wahrscheinlich, daß die Hexitphosphate Intermediäre des Abbaus sind. Es wurde daher nach dem geeigneten Phosphat-Donator der Phosphorylierungsreaktion gesucht.

Die Zugabe von Toluol zu einer Bakteriensuspension stellt einen schweren Eingriff dar. Es werden Teile der Membran herausgelöst, die Zelle wird lebensunfähig. Gleichzeitig wird die Membran durchlässig für eine Reihe von Molekülen (PEP oder andere Phosphate), die die intakte Membran nicht überwinden können. Werden solche Coenzyme zu "toluolbehandelten" Zellen zugesetzt, so ist es möglich, Enzymaktivitäten zu messen, ohne daß die Substratzufuhr berücksichtigt werden muß. Dieses Verfahren muß vor allem dann angewandt werden, wenn Komponenten der Membran an der Enzymreaktion beteiligt sind und daher ein zellfreier Extrakt nicht aktiv wäre.

Aus der Tab. 2 ist ersichtlich, daß Mannit, Sorbit und 2-Desoxysorbit vollständig oder teilweise in Gegenwart von PEP umgesetzt wurden. Mit der Vorstufe des Phosphoenolpyruvats, der 2-Phosphoglycerinsäure, wurden bei diesen Substraten fast die gleichen Aktivitäten wie mit PEP erreicht. Wurde eine 10^{-2}m NaF-Lösung dem Ansatz vor dem Versuchsbeginn zugesetzt, so war praktisch keine Umsetzung mehr nachweisbar. Nur Sorbit wurde - wenn auch im stark eingeschränkten Umfang - noch phosphoryliert. Die Umsätze, die mit allen anderen Coenzymen erzielt wurden, sind unbedeutend. Wahrscheinlich handelt es sich um Restaktivitäten, da auch Ansätze ohne Zugabe irgendwelcher Phosphat-Donatoren ähnliche Aktivitäten des PTS zeigten.

Obwohl in toluolbehandelten Zellen die Substrate ungehinderten Zutritt zu den Enzymen haben, zeigt 3-O-Methylsorbit, Xylit und Arabit keine Phosphatbildung.

Lediglich im Sorbitmedium induzierte Zellen setzten Xylit in Spuren zu Xylitphosphat um.

Einen Beweis dafür, daß membrangebundene Komponenten an der Reaktion beteiligt sind, lieferten die Versuche mit Rohextrakt anstelle der toluolbehandelten Zellen. Keines der Substrate - auch nicht Sorbit, Mannit und 2-Desoxysorbit - bildete innerhalb von 30 Minuten mit irgendeinem der Coenzyme ein Phosphat. Sobald zu diesem Rohextrakt aber die Partikelfraktion zugesetzt worden war, war eine deutliche Phosphorylierung in der Suspension zu registrieren.

Tab. 2 : Phosphatbildung durch Zusatz verschiedener Zuckerphosphate und Coenzyme zu toluolbehandelten Zellen

Ansatz: 0,8 ml Proben enthielten:
1,06 mg Zellen, 10^{-3}m $MgCl_2$, 10 µl Toluol und die radioaktiven Substrate

Inkubation: 20 Minuten bei 37° C.
Es wurde die Gesamtaktivität und der anionische Anteil durch Abtrennung mittels DEAE-Cellulosefilter - wie in Methoden unter 2.9.1. beschrieben - bestimmt.

Konzentrationen und Aktivitäten der Substrate wie in Abb. 3, Coenzyme und Zuckerphosphate 10^{-3}m.

Kultur-medium	Test-zucker	ohne Coenzym +)	NaF +)	PEP + NaF +)	PEP +)	NaF + 2-P-Glyc. Säure +)	2-P-Glyc. Säure +)	G-6-P +)	G-1-P +)	F-1-P +)	F-6-P +)	ATP +)
Sorbit	Sorbit	2.6	0.7	3.5	3.9		3.2	2.2	1.1	2.6	2.3	0.22
Sorbit	2-Dsor	0.19	<0.1	0.73	0.49	<0.1	1.0	0.17	0.19	<0.1	<0.1	<0.1
Sorbit	3-O-M sorbit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sorbit	Xylit	0	0	Sp.++)	Sp.++)	0	Sp.++)	0	0	0	0	0
Sorbit	Arabit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannit	Mannit	2.6	0.2	>18	16.8	0.2	5.3	4.2	2.1	2.6	2.2	2.3
Mannit	Sorbit	1.0	0.2	2.6	2.0		1.1	0.7	0.4	0.4	0.5	0.18
Mannit	2-Dsor	<0.1	<0.1	1.2	1.0	<0.1	1.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Mannit	Xylit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannit	3-O-M sorbit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannit	Arabit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+) Umsatzangaben der Phosphorylierungsreaktion: nMol Phosphat / mg Zellen x min

++) Sp.: Spuren 2-Dsor = 2-Desoxysorbit 3-O-Msorbit = 3-O-Methylsorbit

3.4. Einfluß von NaF auf den Transport und Metabolismus

Kanapka und Hamilton[78] haben enzymatisch einige Zwischenprodukte des Glukoseabbaus nach Embden-Meyerhof in Gegenwart oder Abwesenheit von NaF bestimmt. Auf Grund von Veränderungen in den Konzentrationen gaben sie einen indirekten Einfluß von NaF auf den Transport als wahrscheinlich an. Durch eine Enolasehemmung wird das Angebot an PEP, das für den PEP-abhängigen Phosphotransferase-Weg benötigt wird, verringert. Das wirkt sich in einer Verlangsamung bzw. Blockierung der Aufnahme von Glukose aus. Da die von uns entwickelten Methoden vorzüglich geeignet waren, Aussagen über die Aufnahmerate und gleichzeitig den intrazellulären Zustand des aufgenommenen Substrats zu machen, wurden solche vergleichenden Untersuchungen für Sorbit und Mannit ausgeführt.

In einer Versuchsreihe wurden die Zellen vor der Substratzugabe 15 Minuten mit dem NaF vorinkubiert. Die Ergebnisse für Sorbit als Substrat sind in den Abb. 5 und 6 wiedergegeben. Bei geringer Fluoridmenge (10^{-5}m) tritt eine scheinbare Erhöhung der Aufnahmerate auf. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei dieser Konzentration die Enolase leicht inhibiert wird. Daher sammelt sich auch 2-P-Glycerinsäure intermediär an. Fluoridkonzentrationen von 10^{-3}m oder höher bewirken, daß sich im Cytoplasma fast ausschließlich 2-P-Glycerinsäure anreichert. Die Ursache dürfte eine totale Blockierung des Enzyms Enolase sein. Wie schnell die Hemmung der Enolase eintritt, ist aus Abb. 7 erkennbar.

Abb. 5 :

Einfluß von NaF verschiedener Konzentrationen auf die Sorbit-Aufnahme

Abb. 6 :

Intrazellulärer Zustand des aufgenommenen Sorbits in Gegenwart verschiedener NaF-Konzentrationen

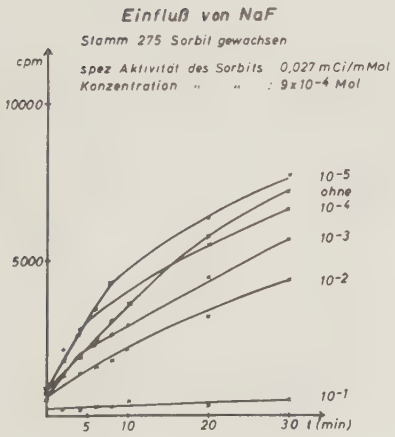
Die Zellen waren in einem Medium mit 1% Sorbit gewachsen. Nach dem Resuspendieren in zuckerfreiem Medium wurde der Versuch durch die Zugabe von radioaktivem Substrat gestartet. Eingesetzt wurde Sorbit-C14:

9×10^{-4}m; 0,027 mCi/mMol
Proben von je 3 ml (=1 mg Trockengewicht) wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen, abfiltriert und im LSC gemessen

9×10^{-4}m; 0,162 mCi/mMol
Nach 30-minutiger Inkubation wurden 1 mg Zellen mit n-Butanol/Aceton/Wasser extrahiert. Der Extrakt wurde - wie in 2.6. und 2.7. beschrieben - chromatographiert und eine Autoradiographie erstellt.

Belichtungszeit: 2 Tage

Zuordnung der Intermediäre S. 43



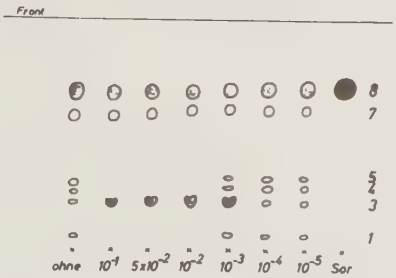
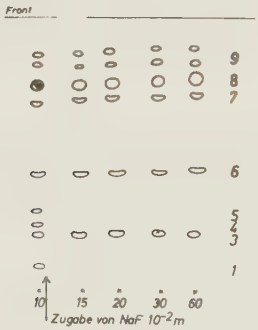


Abb. 7 : Zugabe von 10^{-2}m NaF während der Inkubation mit Sorbit

Die Zellen wurden im 1% Sorbitmedium induziert und nach dem Resuspendieren in zuckerfreiem Medium mit Sorbit-C14 ($5x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol) inkubiert. Die erste Probe wurde nach 10 Minuten entnommen. Danach wurde eine NaF-Lösung zugegeben, so daß eine Konzentration von 10^{-2}m NaF erreicht wurde. Nach 15, 20, 30 und 60 Minuten wurden weitere Proben entnommen. Weitere Aufarbeitung wie in Abb. 6.

Belichtungszeit: 21 Tage

Zuordnung der Intermediäre Seite 43



Vor der Zugabe von NaF sind eine Reihe von Metaboliten nachweisbar. Danach ist hauptsächlich 2-Phosphoglycerinsäure vorhanden. Alle anderen Metaboliten sind nur noch in Spuren erkennbar. 2-P-Glycerinsäure wird auch im Verlauf der nächsten 45 Minuten nicht weiter abgebaut.

Bei hohen Fluoridkonzentrationen dagegen wird auch die Aufnahmerate des Substrats reduziert.

Mit diesen Ergebnissen können wir die Schlüsse von Kanapka und Hamilton bestätigen. Fluorid wirkt also am stärksten auf die Enolase. Das Enzym Aldolase wird in vivo nicht in auffälliger Weise durch NaF gehemmt, obwohl im zellfreien Extrakt bei einer 10^{-2}m NaF-Lösung eine 100%-ige Inhibition festgestellt wurde.

Vergleicht man den Einfluß von 10^{-2}m NaF auf die Sorbit-Aufnahme mit der Mannit- (Abb. 8) und Glukose-Aufnahme (Abb. 15), so ist auffallend, daß bei Sorbit noch keine starke Reduktion der Aufnahmerate zu verzeichnen ist, während bei den anderen Substraten der Transport weitgehend blockiert ist. Deshalb wurde bei dieser Konzentration die Phosphatbildung in intakten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.

Abb. 9 zeigt eine Zunahme des Phosphatanteils im Verlauf der Inkubation, während nach 1 Minute nur 8% des aufgenommenen Substrats phosphoryliert waren, stieg dieser Anteil innerhalb von 30 Minuten auf fast 60% an. Neben der Phosphatkomponente, die als

2-Phosphoglycerinsäure identifiziert wurde, war nur noch freier Sorbit im Zellinnern nachzuweisen.
Bei dieser hohen Fluoridkonzentration ist also die Aufnahme nicht - wie beim PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase-System - mit dem Transport gekoppelt, d.h. es muß noch ein weiterer Weg der Sorbit-Aufnahme neben dem PEP-abhängigen Phosphotransferase-System bestehen.

Abb. 8 : Einfluß von NaF verschiedener Konzentrationen auf die Mannit-Aufnahme

Die Zellen wurden in einem 1% Mannitmedium angezogen und nach dem Resuspendieren in zuckerfreiem Medium mit Mannit-1-C14 ($5x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol) versetzt.

Probenentnahme und Aktivitätsmessung wie in Abb. 5

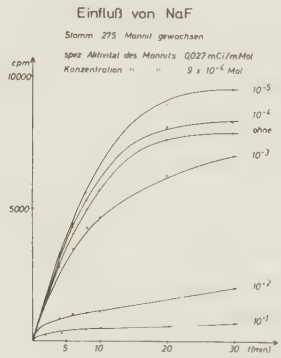
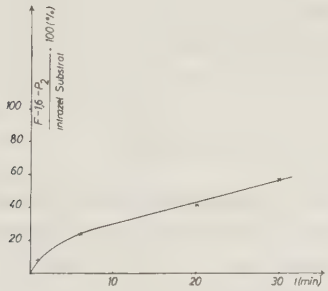


Abb. 9 : Anteil von phosphoryliertem Produkt am insgesamt aufgenommenen Sorbit

Die Zellen wurden - wie in Abb. 4 - auf den Versuch vorbereitet. Nach 15-minutigem Vorinkubieren mit 10^{-2}m NaF wurde der Test durch die Zugabe von Sorbit-C14 (9×10^{-4}m; 0,162 mCi/mMol) gestartet.

Proben zu 3 ml (= 1 mg Trockengewicht) wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen, abfiltriert und die Zellen mit Butanol/Aceton/Wasser extrahiert. Mit dem Extrakt wurde die Gesamtaktivität und die des anionischen Anteils - wie unter Methoden (2.9.1.) beschrieben - mittels DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher bestimmt.



3.5. Einfluß anderer Stoffwechselinhibitoren

Um den Einfluß von Stoffwechselinhibitoren auf den Transport und Metabolismus auf einfache Weise abschätzen zu können, wurden sehr niedere Substratkonzentrationen gewählt; denn unter diesen Bedingungen findet - wie in Abb. 3 dargestellt - eine rasche Aufnahme und ein ebenso rascher Abbau statt. Wird der Abbau geblockt - dies konnten wir für NaF bereits in den Abb. 5 und 6 zeigen - so muß sich das Substrat in den Zellen anreichern. Wird bereits die Aufnahme blockiert, so darf kein intrazelluläres Substrat nachweisbar sein. Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung sind ohne jeglichen Einfluß auf die Aufnahme und den Stoffwechsel, wie die Abb. 10 für 2,4-Dinitrophenol und Natriumazid zeigt. Also ist die Atmungskette ohne Bedeutung für diese Streptokokken. NaN_3 war auch bei Strep. lactis ohne Einfluß auf den Laktoseabbau, während 10^{-2}m NaF vollkommen den Metabolismus unterbrach[55].

3.6. Effekt von Proteinreagenzien

Diese Reagenzien, die an der Thiolgruppe von Proteinen angreifen, werden sehr häufig in der Enzymforschung angewandt. Sie zeigten auch - wie im Kapitel 1.2.3. über erleichterte Diffusion bei E. coli dargestellt - bei einer Reihe von "Permeasen", also Proteinen, die für die Substratbindung verantwortlich sind, eine Hemmwirkung auf die Aufnahme, wenn im aktiven Zentrum eine Sulfhydrylgruppe vorhanden war. Aus der Abb. 11 ist ersichtlich, daß die Aufnahme des Substrats Mannit

Abb. 10 und 11 : Einfluß von Stoffwechselinhibitoren und Proteinreagenzien auf den Transport und Metabolismus von Mannit

Abb. 10: Stoffwechselinhibitoren

Abb. 11: Proteinreagenzien

Die Zellen wurden nach der Anzucht im 1% Mannitmedium in der log-Phase geerntet. Vor dem Versuchsbeginn wurde mit den Inhibitoren mindestens 30 Minuten vorinkubiert. Der Start erfolgte durch Zugabe des Substrats Mannit-1-C14 ($5x10^{-8}$m; 16,8 mCi/mMol).

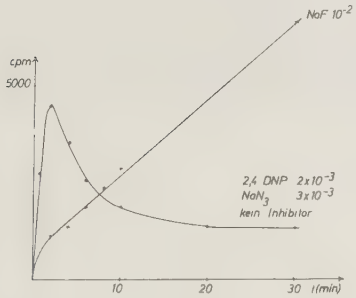
Proben zu 3 ml enthielten:

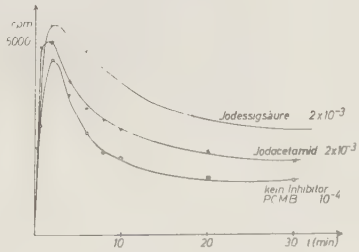
1 mg Zellen (Trockengewicht), 100 µg CAP

und die Inhibitoren:

Natriumfluorid (10^{-2}m); 2,4-Dinitrophenol(2,4-DNP) ($2x10^{-3}$m); Natriumazid ($3x10^{-3}$m); Jodessigsäure und Jodacetamid (je $2x10^{-3}$m); p-Chlormercuribenzoesäure; Nasalz (PCMB) (10^{-4}m)

Bestimmung der aufgenommenen Radioaktivität nach der Filtration im LSC.





durch die Vorinkubation mit diesen Reagenzien nicht beeinflußt wird. Da in diesen Versuchen die Konzentration in den vorbehandelten Zellen nach dem Maximum langsamer abnimmt als bei unbehandelten, ist eine geringe Hemmung im Stoffwechsel wahrscheinlich. So wurde z.B. für die M-1-P-DH in zellfreiem Extrakt eine starke Hemmung durch Jodacetamid und p-Chlormercuribenzoat (PCMB) nachgewiesen[4)], wenn die gleichen Konzentrationen wie bei diesen Versuchen angewandt wurden.

Die fehlende oder nur sehr geringe Hemmwirkung liegt wohl daran, daß diese Moleküle - wenn überhaupt - nur sehr langsam die Membran überwinden können. Eine Beeinflussung ist dann möglich, wenn Komponenten des Transportsystems an der Außenseite der Membran mit dem Inhibitor in Wechselwirkung treten können. Somit darf festgestellt werden, daß beim Mannit-Transport "Permease"-Proteine mit Thiolgruppen im aktiven Zentrum keine Rolle spielen.

3.7. Kompetitive Hemmung der Aufnahme

Über die Stereospezifität des Transports eines bestimmten Zuckers geben die Messungen der Aufnahmerate in Gegenwart eines großen Überschusses eines anderen Analogons Aufschluß, wenn - wie nach unseren bisherigen Ergebnissen zu erwarten ist - der Transport durch ein enzymatisches System erfolgt. Die Aufnahmerate in Gegenwart einer 100-fach

größeren Menge eines zweiten Substrats wird mit der Rate in Abwesenheit einer zweiten Substanz verglichen.

In der Tab. 3 sind die verschiedenen Kombinationen dargestellt. Von den 34 Kombinationen zwischen Sorbit und Mannit mit den anderen Substraten zeigten nur 13 eine geringere Inhibition als 20%. Deshalb darf der Transport der beiden Hexite als spezifisch angesehen werden. Das Transportsystem für Mannit ist spezifischer als das des Sorbits. Mit beiden Zuckeralkoholen konkurrierten die Substrate Glukose, Galaktose, 2-Desoxyglukose und 2-Desoxysorbit erfolgreich. Von den Pentiten Xylit, Arabit, Ribit hatte nur Xylit im Mannit-Transport einigen Einfluß, jedoch keiner auf das Sorbit-Transportsystem. Die gegenseitige Beeinflussung zwischen Sorbit und Mannit beim Transport ist unwesentlich. So ist für Sorbit die Aufnahmerate in Gegenwart von Mannit noch 90% und umgekehrt 72%. Signifikant sind die Unterschiede zwischen den Hexiten und den zugehörigen Hexosen. Mannose konkurriert mit Sorbit um den Transport, während dies Mannit nicht kann. Galaktose ist ein wirkungsvoller Hemmer der Sorbit- und Mannit-Aufnahme, wobei Dulcit vollkommen wirkungslos ist. Die Ketohexosen Fruktose und Sorbose können verhältnismäßig wenig wirksam um den Hexittransport konkurrieren. Das cyclische Polyol m-Inosit verursacht nicht die geringste Inhibition.

Tab. 3 : Aufnahme von Sorbit und Mannit in Gegenwart eines zweiten Zuckers oder Zuckeralkohols

Die Zellen wurden im Sorbit- oder Mannitmedium bis zur mittleren log-Phase angezogen und in zuckerfreiem Medium (O.D. = 1) resuspendiert. Der Versuchsansatz von 3 ml enthielt:

Chloramphenicol (33 µg/ml), Zellen 333 µg/ml), nicht radioaktiven Zucker ($5x10^{-2}$m) und radioaktiven Zucker ($5x10^{-4}$m)

Die Zuckeraufnahme wurde nach 20 Minuten Inkubation durch Filtration abgestoppt und die Bakterien mit 5 ml kaltem, zuckerfreiem Medium gewaschen. Die Menge an radioaktiven Zuckern, die in Abwesenheit von nicht radioaktiven Zuckern aufgenommen wurde, wurde als Standard-Aufnahme (100%) festgesetzt und die Aufnahme in Gegenwart eines unmarkierten Zuckers als Prozent von diesem Wert berechnet.

unmarkierter Zucker	Sorbit-Kultur		Mannit-Kultur	
	Sorbit-C14	2-Desoxy-sorbit-C14	Mannit-1-C14	2-Desoxy-sorbit-C14
m-Erythrit	22	12	68	16
Ribit	63	60	84	60
Xylit	39	33	15	10
D-Arabit	45	9	72	10
D-Arabinose	47	51	72	9
D-Glukose	12	10	12	10
D-Sorbit	2	9	90	6
2-Desoxy-D-glukose	5	5	15	10
2-Desoxy-D-sorbit	5	7	16	9
3-O-Methyl-D-glukose	25	12	75	45
D-Mannose	15	14	22	5
D-Mannit	72	27	10	8
D-Galaktose	8	9	11	6
D-Dulcit	103	118	95	130
D-Fruktose	33	11	25	4
L-Sorbose	15	5	38	20
m-Inosit	108	110	105	110

Betrachtet man die 34 Kombinationen, die sich mit 2-Desoxysorbit als Testzucker niederer Konzentration und den 17 Substraten bei Sorbit- bzw. Mannit-induzierten Zellen ergeben, so sind nur in 11 Fällen die Aufnahmeraten größer als 20%.

Ribit, Dulcit und m-Inosit sind sowohl bei Sorbit- als auch bei Mannit-induzierten Zellen ohne Einfluß auf die Aufnahme von 2-Desoxysorbit. Die Konkurrenz von 2-Desoxysorbit mit Xylit, Arabinose und Mannit ist gering bei Sorbit-induzierten Zellen, bei Mannit-gewachsenen Zellen inhibiert 3-O-Methylglukose die Aufnahme dieses Desoxysorbits kaum. Mit diesen Vergleichen wird deutlich, daß 2-Desoxysorbit nur dann nicht mit anderen Substraten konkurriert, wenn weder beim Sorbit- noch beim Mannittransport eine Beeinflussung durch dieses Substrat auftrat. Dies kann als Beweis angesehen werden, daß 2-Desoxysorbit sowohl über das Sorbit- als auch über das Mannittransportsystem in die Zellen gelangen kann.

3.8. Rücktransport durch Zugabe eines anderen Substrats

Weitere Beweise für die Konkurrenz zweier Substrate um den Transport wurden durch folgendes Experiment gewonnen. Die Zellen wurden in einem Hexitmedium induziert und mit radioaktivem Substrat solange inkubiert, bis eine Sättigung der Zellen eintrat. Da das Substrat nicht abgebaut werden sollte, wurden dazu die Hexitanaloga Xylit und 2-Desoxysorbit ausgewählt. Dann wurde rasch ein zweites, unmarkiertes Substrat zugesetzt. Erfolgte eine schnelle

Abnahme der intrazellulären Konzentration, so bedeutete das einen Austausch des ersten Substrats gegen das zweite Substrat. Die beiden Substrate konkurrieren also um den Transport.

Um die Konzentrationsunterschiede zwischen dem Medium und dem Cytoplasma aufzuzeigen, wurde für die in Abb. 12 a - d dargestellten Versuche mit den von Kashket und Wilson[77] bei Streptococcus lactis bestimmten Werten die intrazelluläre Konzentration des aufgenommenen Substrats berechnet. Danach entspricht die in den Versuchen eingesetzte Menge von 0,53 mg Trockengewicht Bakterien einem Zellwassergehalt von 0,77 µl.

Die Zugabe eines bis zu 10-fachen Überschusses an Sorbit, Mannit oder 2-Desoxysorbit zu den Zellen, die mit radioaktivem Xylit vorinkubiert waren, löste keinen nennenswerten Rückfluß von Xylit aus dem Cytoplasma aus. Es war gleichgültig, ob die Zellen in einem Sorbitmedium (Abb. 12 a) oder einem Mannitmedium (Abb. 12 c) induziert worden waren. In der Abb. 12 b ist dargestellt, welchen raschen Rücktransport von 2-Desoxysorbit ein Zusatz von Mannit, Sorbit, 2-Desoxysorbit und Glukose bei Sorbit-induzierten Zellen verursacht. Bei im Mannitmedium angezogenen Bakterien wurde nach einem Zusatz von Glukose und Mannit ein etwa gleichgroßer Rücktransport wie in Abb. 12 b gemessen. Jedoch war der Einfluß von Sorbit und 2-Desoxysorbit - wohl auf Grund der reduzierten Aufnahmerate für Sorbit - (wie in Abb. 12 a dargestellt) geringer als bei 12 b. Der Rücktransport, der durch Galaktose

hervorgerufen wurde, war bei Sorbit- und Mannit-induzierten Zellen vergleichbar, jedoch viel geringer als der durch die anderen Zucker hervorgerufene.

Da aufgenommener 2-Desoxysorbit fast ausschließlich als das entsprechende Phosphat im Cytoplasma vorkommt (Abb. 4) , geht eine Abnahme des angesammelten Substrats auf Kosten des 2-Desoxysorbitphosphats. Da im Medium mittels Autoradiographie kein 2-Desoxysorbitphosphat nachweisbar war, muß also durch eine Dephosphorylierungsreaktion zunächst wieder das ursprüngliche Substrat entstehen. Dieses entphosphorylierte Substrat wird dann aus dem Cytoplasma durch die Membran an das Medium abgegeben. Eine Dephosphorylierung wurde auch von Hengstenberg et al.[74] beim Laktose- und α-Methylglukose-Rücktransport beobachtet.

Abb. 12 a - d : Rücktransport der Hexitanaloga nach Zugabe eines zweiten Substrats

Die Zellen wurden im Sorbitmedium (Abb. 12 a, b) oder Mannitmedium (Abb. 12 c, d) induziert und mit dem radioaktiven Hexitanalogon Xylit-C14 (Abb. 12 a, 12 c) bzw. 2-Desoxysorbit-1-C14 (Abb. 12 b, 12 d) inkubiert. Nach 30 Minuten wurde ein fünffacher Überschuß an einem unmarkierten zweiten Substrat zugesetzt. Proben zu je 0,4 ml mit 0,53 mg Zellen; 0,12 µg CAP wurden zu den angebenen Zeiten entnommen, abfiltriert und gewaschen.

LSC-Technik zur Radioaktivitätsbestimmung.

Konzentrationen und spez. Aktivitäten:

Xylit-C14 (10^{-4}m; 3,3 mCi/mMol), 2-Desoxysorbit-1-C14 (10^{-4}m; 1 mCi/mMol)

unmarkierte Substrate:

Sorbit (Sor), Mannit (Man), 2-Desoxysorbit (2-Dsor), Glukose (Glu), Galaktose (Gal), Dulcit (Dul) (alle 5×10^{-3}m)

----- Konzentration im Medium

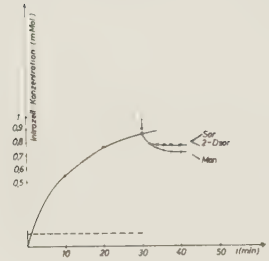


Abb. 12 a

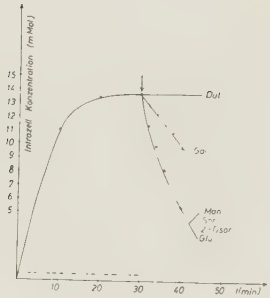


Abb. 12 b

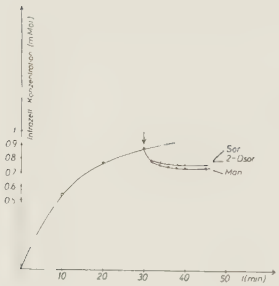


Abb. 12 c

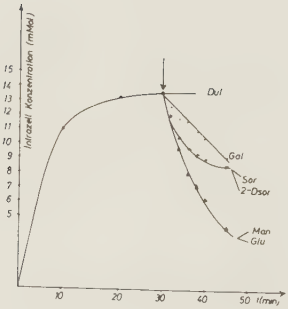


Abb. 12 d

3.9. Diskussion

Bereits die Bedingungen, unter denen eine optimale Aufnahmerate erreicht wurde, machten es wahrscheinlich, daß der Transport von Sorbit und Mannit durch ein oder mehrere Enzymsysteme erfolgt. Nur wenn die Zellen vorher in einem Hexitmedium induziert worden waren, konnten die Zuckeralkohole rasch aufgenommen werden. Für die Analoga 2-Desoxysorbit und Xylit war es schwieriger in das Cytoplasma zu gelangen. Die unterschiedlichen Aufnahmeraten für Sorbit und Mannit bei im Mannitmedium-gewachsenen Zellen waren ein erster Hinweis dafür, daß die Aufnahme der beiden Hexite durch zwei verschiedene Transportsysteme durchgeführt wird.

Schon unmittelbar nach dem Inkubationsbeginn war bei den abbaufähigen Hexiten eine Reihe von Metaboliten intrazellulär nachweisbar. Bei den Analoga fanden sich ausschließlich die entsprechenden Phosphate neben geringen Mengen nicht veränderten Substrats. Deshalb war anzunehmen, daß der Transport und die Phosphorylierung gekoppelt waren.

Als der am besten geeignete Phosphatdonator für Sorbit, Mannit und 2-Desoxysorbit erwies sich PEP bzw. seine Vorstufe 2-Phosphoglycerinsäure. Natriumfluorid konnte eine Phosphorylierung in Gegenwart von PEP nicht hemmen, verhinderte sie aber, wenn dieses Coenzym nicht zugegeben worden war. Dies sind Kriterien, die für das erstmalig von Kundig et al.[21] beschriebene PEP-abhängige Zucker-Phosphotransferase-System charakteristisch sind. Im Gegensatz zu der bei

den Enterobakterien[23)27)28)51)] gefundenen Phosphorylierung auch im Rohextrakt (das ist der Überstand nach 20-30 Minuten Zentrifugation bei 25-35.000 g), konnten wir für Sorbit oder Mannit keine Reaktion feststellen. Auch Laktose wurde bei Strep. lactis[55)] und Staphylococcus aureus[40)] nicht durch einen Rohextrakt phosphoryliert.

Da für Sorbit als Substrat auch in Gegenwart von 10^{-2}m NaF in intakten Zellen eine deutliche Substrataufnahme zu registrieren war, muß für diesen Hexit neben dem PEP-abhängigen Phosphotransferase-System noch ein weiteres Transportsystem tätig sein, das Sorbit aufnimmt, ohne daß der Transport an eine Phosphorylierung gekoppelt ist.

Weitere Beweise dafür, daß die beiden PEP-abhängigen Hexittransportsysteme voneinander unabhängig sind, lieferten die Versuche der kompetitiven Hemmung. Mannit-induzierte Zellen nahmen auch in Gegenwart der 100-fachen Menge Sorbit die gleiche Menge Mannit auf, wie in dessen Abwesenheit. Umgekehrt konnten im Sorbitmedium gewachsene Zellen in Gegenwart eines Überschusses an Mannit noch 70% des Sorbits aufnehmen. Berkowitz hatte - wie in 1.4.4.1. ausgeführt - für S. typhimurium gefunden, daß Sorbitkonzentrationen von 10^{-4}m bis 10^{-3}m die Mannit-Aufnahme nicht beeinflussen konnten, und daß Sorbit-negative Mutanten Mannit mit beinahe gleicher Rate wie der Wildtyp aufnahmen.

Mit den Experimenten der kompetitiven Hemmung konnte auch bestätigt werden, daß-wie zu erwarten war-

2-Desoxysorbit ein Substrat des Sorbit- und des Mannittransports ist. Nur wenn bei keinem der beiden Transportsysteme eine Konkurrenz zwischen Mannit und Sorbit und einem Substrat in großem Überschuß nachweisbar war, so war auch für 2-Desoxysorbit keine Konkurrenz mit diesem Substrat um den Transport feststellbar.

Da Sorbit und Mannit einen Rückfluß von bereits aufgenommenem 2-Desoxysorbit verursachen, ist dies ein weiterer Beweis dafür, daß 2-Desoxysorbit durch die beiden Hexittransportsysteme in das Zellinnere gelangt.

Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied. Wird zu Mannit-gewachsenen Zellen, die intrazellulär 2-Desoxysorbit-1-C14 angesammelt haben, ein Überschuß von Sorbit oder 2-Desoxysorbit zugesetzt, so ist die Rückflußgeschwindigkeit des Hexit-Analogons geringer als nach Zugabe von Glukose oder Mannit (Abb. 12 d). Bei Sorbit-induzierten Zellen ist für diese Substrate keine unterschiedliche Rückflußgeschwindigkeit meßbar (Abb. 12 b). Eine Erklärung ist die unterschiedliche Aufnahmegeschwindigkeit, wie sie in Abb. 2 a und 2 b dargestellt wurde. Mannit-induzierte Zellen können nur langsamer Sorbit und 2-Desoxysorbit aufnehmen als Sorbit-induzierte Zellen.

Glukose ist in beiden Transportsystemen ein echter Konkurrent, während die Affinität von Galaktose geringer ist.

Stoffwechselinhibitoren, deren Wirkung auf der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung beruht, sind ohne Einfluß auf den Hexittransport. Reagenzien, die an die Sulfhydrylgruppe eines Proteins binden, verursachten keine Inhibition der Aufnahme. Es ist also unter den Komponenten des PEP-abhängigen Mannit-Phosphotransferase-Systems kein Protein vorhanden, das im aktiven Zentrum eine solche Gruppe

besitzt. In der Literatur wurde eine Inhibition durch die beiden Hemmer-Gruppen bisher noch nicht für ein PTS beschrieben. Nur im aktiven Transport, wenn "Carrier" als bewegliche Proteine in der Membran angenommen werden mußten[20], ist eine solche Hemmung nachgewiesen worden. Diese "Carrier" besitzen oft eine solche blockierbare Sulfhydrylgruppe. Die Zugabe von Stoffwechselinhibitoren verursacht die Umwandlung des aktiven Transports in die erleichterte Diffusion.

Xylit wurde von intakten Zellen nur mit einer geringen Rate aufgenommen. In den Zellen angesammeltes, weitgehend phosphorylierter Xylit konnte durch die Zugabe eines Überschusses an Mannit, Sorbit oder 2-Desoxysorbit nur wenig beeinflußt werden. Eine Aktivität eines PEP-abhängigen Xylit-Phosphotransferase-Systems in toluolbehandelten Zellen war für Mannit-induzierte Zellen nicht zu entdecken und für Sorbit-gewachsene Zellen nur in Spuren nachweisbar. Es kann also festgestellt werden, daß Xylit kein Konkurrent zu den Hexiten im Hexittransportsystem ist.

Noch geringer als die Aufnahme von Xylit war die von 3-O-Methylsorbit. Mittels Autoradiographie konnte kein phosphoryliertes Produkt erkannt werden. Auch durch die Zugabe von verschiedenen Phosphatdonatoren zu toluolbehandelten Zellen wurde keine Phosphatbildung erzwungen, obwohl bei dieser Versuchsanordnung die Barriere der Membran umgangen wurde. Das Substrat verliert also durch die verhältnismäßig sperrige Methylgruppe seine Fähigkeit mit Enzymen,

die ähnliche Substrate umsetzen, in Wechselwirkung zu treten. 3-O-Methylsorbit ist also ungeeignet für die Charakterisierung eines Sorbittransportsystems.

Auch mit Arabit wurde bei toluolbehandelten Zellen trotz Zugabe von PEP und anderer Phosphatverbindungen keine Phosphatbildung gemessen. Dallmeier[100] hatte bereits gezeigt, daß Arabit weder eine nennenswerte Sorbit-6-P- noch Mannit-1-P-DH-Aktivität besitzt.

Alle getesteten Hexitanaloga sind deshalb, wenn auch aus unterschiedlichen Gründen, für eine Charakterisierung des Sorbit- bzw. Mannittransports ungeeignet.

Signifikant war die viel stärkere Reduzierung der Aufnahme von Sorbit und Mannit durch die Gegenwart der Hexosen Glukose, Mannose und Galaktose gegenüber den entsprechenden Zuckeralkoholen Sorbit, Mannit und Dulcit. Diese Befunde lassen die Annahme zu, daß die ringförmigen Halbacetalstrukturen der Hexosen leichter um den Transport konkurrieren können, als die offenkettigen Formen der Hexite. Das einzige getestete cyclische Polyol, der m-Inosit, hatte weder auf den Sorbit- noch auf den Mannittransport einen Einfluß.

Interessante Ergebnisse lieferten die Studien über den Einfluß von NaF auf den Abbau der Hexite. Es konnte gezeigt werden, daß die Enolase bei Fluoridkonzentrationen von 10^{-1}m bis 10^{-5}m das am stärksten gehemmte Enzym war, wenn die Zellen mit dem

Inhibitor vorbehandelt worden waren. 2-P-Glycerinsäure reicherte sich auch dann an, wenn 10^{-2}m NaF erst während der Inkubation zugesetzt wurde. Im zellfreien Extrakt wirkte aber NaF in einer Konzentration von 10^{-2}m als totaler Hemmer der Fruktose-1,6-diphosphat-Spaltung. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten in vivo und in vitro könnte sein, daß der Hemmer nicht die Aldolase erreichen kann. Bei Aldolase handelt es sich um ein sog. "lösliches" Enzym, d.h. es kommt im Cytoplasma vor - die Enolase dagegen ist membrangebunden. Damit ist die Wirkung von NaF auf membrangebundene Enzyme begrenzt.

4. Transport und Phosphorylierung bei Hexosen und Disacchariden

4.1. Vorbemerkung

Nachdem für den Transport und die Phosphorylierung der Hexite Sorbit und Mannit eine Beteiligung des PEP-abhängigen Phosphotransferase-Systems aufgezeigt werden konnte, sollte mit wenigen Untersuchungen festgestellt werden, ob solche Systeme auch für den Transport der Hexosen und Disaccharide verantwortlich sind.

Da unsere Methoden vorzüglich geeignet waren, den Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Natriumfluorid auf den Stoffwechsel auf einfache Weise zu zeigen, wurden vergleichende Untersuchungen mit den genannten Zuckern durchgeführt.

Außerdem wurde geprüft, inwieweit nicht fermentierbare Glukose-Analoga bei Untersuchungen des Transports von Strep. mutans eingesetzt werden können. Die Verwendung von nicht fermentierbaren Glukose-Analoga wird von einer Reihe von Autoren vorgeschlagen, wenn der Transport unabhängig vom Stoffwechsel studiert werden soll.

4.2. Aufnahmeraten von Glukose und Glukose-Analoga

Die Abb. 13 beweist, daß für die Aufnahme von Glukose keine Induktion erforderlich ist; denn im Mannitmedium gewachsene Zellen konnten rasch Glukose aufnehmen. Gleiche Resultate waren auch bei Sorbit-

induzierten Bakterien nachzuweisen. Diese Ergebnisse sind nicht unerwartet, denn für fast alle Mikroorganismen wurde festgestellt, daß der Glukosetransport konstitutiv ist, während für die meisten anderen Kohlenhydrattransportsysteme eine Induktion notwendig ist.

Die Glukose-Analoga 3-O-Methylglukose und α-Methylglukose können nur erheblich langsamer die Barriere der Zellmembran überwinden. Dies ist ein Zeichen dafür, daß diese gegenüber Glukose veränderten Substrate nicht die gleiche Affinität zum Glukosetransportsystem besitzen wie Glukose. Wie die Hexite wurde die Glukose sofort metabolisiert (Abnahme der intrazellulären Konzentration innerhalb 30 Minuten, Abb. 13).

Aus der Abb. 14 ist ersichtlich, daß die im Cytoplasma angesammelten Analoga teilweise phosphoryliert sind. Der Nachweis für die Phosphatbildung konnte wieder dadurch erbracht werden, daß die unbekannten Derivate mit saurer Phosphatase behandelt wurden. Eine nachfolgende chromatographische Trennung wies nur noch das ursprünglich eingesetzte Substrat aus.

Abb. 13 : Aufnahme von Glukose und Glukose-Analoga durch Mannit-induzierte Zellen

Die Bakterien wurden im 1% Mannitmedium angezogen und während der log-Phase geerntet. Nach der Resuspendierung in zuckerfreiem Medium war der Versuchsbeginn die Zugabe von radioaktivem Substrat.
3 ml Proben, die 1 mg Zellen und 100 µg CAP enthielten, wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen, die Bakterien über Filter abgetrennt, gewaschen und die Radioaktivität im LSC gemessen.

Substrate: Glukose-C14, Mannit-1-C14, 3-O-Methyl-(Glukose-C14), Methyl-(α-Glukose-C14) (9×10^{-4} m; 0,027 mCi/mMol)

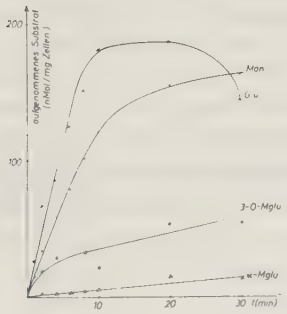


Abb. 14 : Intrazellulärer Zustand der aufgenommenen Glukose-Analoga

Die Zellen wurden im Glukosemedium angezogen und mit den radioaktiven Glukose-Analoga 1 Stunde oder 2 Stunden inkubiert. Die durch Filtration abgetrennten Zellen wurden mit n-Butanol/Aceton/ H_2O extrahiert und der Extrakt - wie in Methoden unter 2.7. beschrieben - chromatographiert.

Chromatogramm 1 und 2 :

Substrat: 3-O-Methyl-(Glukose-Cl4)
($1{,}8 \times 10^{-3}$m; 0,162 mCi/mMol)

1 = 1 Stunde
2 = 2 Stunden inkubiert

Chromatogramm 3 und 4 :

Substrat: α-Methyl-(Glukose-Cl4)
($1{,}8 \times 10^{-3}$m; 0,162 mCi/mMol)

3 = 1 Stunde
4 = 2 Stunden inkubiert

Belichtungszeit: 7 Tage
Identifizierung: Obere Flecken = Substrat
Untere Flecken = phosphoryliertes Substrat

4.3. Untersuchung des Phosphat-Donators der Phosphorylierung

In dieser Versuchsreihe wurde getestet, ob auch bei den Hexosen PEP und 2-Phosphoglycerinsäure die am besten geeigneten Phosphatspender der Phosphorylierungsreaktion in toluolbehandelten Zellen sind. Dies konnte - wie in der Tab. 4 dargestellt - einwandfrei für Glukose und Fruktose bestätigt werden. Auf der anderen Seite war für Galaktose durch keinen der Phosphatdonatoren mit Ausnahme von ATP eine signifikante Phosphatbildung zu beobachten. Auch bei ß-Thiomethylgalaktosid, einem ß-Galaktosid-Analogon, das häufig zu Untersuchungen des Laktosetransports benutzt wurde, zeigte sich keine signifikante Phosphorylierungsaktivität. Es muß daher angenommen werden, daß sowohl Glukose als auch Fruktose durch ein PEP-abhängiges Phosphotransferase-System in das Cytoplasma gelangen. Galaktose erzielte mit ATP als Phosphatdonator den relativ größten Umsatz. Die Ergebnisse mit ß-Thiomethylgalaktosid als Laktose-Analogon sind kritisch zu betrachten, da Untersuchungen von Mechery[101] ergaben, daß die ß-Galaktosidase, das Enzym das Laktose in Glukose und Galaktose spaltet, durch eine Behandlung der Zellen mit Toluol und anderen lipidlösenden Lösungsmitteln stark an Aktivität für die Spaltung von o-Nitrophenylgalaktosid verliert.

Tab. 4 : Phosphatbildung durch Zusatz verschiedener Zuckerphosphate und Coenzyme zu toluolbehandelten Zellen

Ansatz: 0,8 ml Proben enthielten: 10^{-2}m NaF, 10^{-3}m Coenzyme oder Phosphate 1,06 mg Zellen, 10^{-3}m $MgCl_2$, 10 µl Toluol und die radioaktiven Substrate

Inkubation: 20 Minuten bei 37° C

Es wurde die Gesamtaktivität und der anionische Anteil durch Abtrennung mittels DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher-Filter - wie in Methoden unter 2.9.1. beschrieben - bestimmt.

Konzentrationen und spez. Aktivitäten der Substrate:

Glukose-C14, Fruktose-C14 und Galaktose-C14 ($5x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol)
ß-Methyl-C14-Thiogalaktosid ($5x10^{-4}$m; 1 mCi/mMol)

Kultur-medium	Test-zucker	ohne Coenzym +)	NaF +)	NaF + PEP +)	PEP +)	2-P-Glyc. Säure +)	G-6-P +)	G-1-P +)	F-1-P +)	F-6-P +)	ATP +)
Glukose	Glukose	1.3	0.7	9.2	3.6	3.9	0.5	0.6	0.5	0.6	0.5
Fruktose	Fruktose	0.8	0.7	5.1	2.7	4.6	0.6	0.6	0.5	0.8	0.8
Laktose	TMG	1.4	<0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3
Galaktose	Galaktose	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.9

+) Umsatzangaben der Phosphorylierungsreaktion: nMol Phosphat/mg Zellen x min.

4.4. Einfluß von NaF auf den Transport und Abbau von Zuckern in intakten Zellen

Da Glukose eines der wichtigsten Substrate der Plaquestreptokokken darstellt, wurde der Einfluß von verschiedenen Fluoridkonzentrationen auf den Transport und Metabolismus dieses Substrats eingehend untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abb. 15 und 16 wiedergegeben. Es sind sowohl bei den Aufnahmeraten als auch bei den Zwischenprodukten keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Resultaten bei den Hexiten feststellbar. Nur die Aufnahme von Glukose ist bereits in den 10^{-3}m NaF-Lösungen stark reduziert und bei noch höheren Konzentrationen wird die Substrataufnahme weitgehend blockiert.

In den Abb. 17 und 18 sind Vergleiche zwischen Sorbit, Mannit, Fruktose, Galaktose, Laktose und Saccharose angestellt. Bei den Hexosen und Hexiten ist das bei einer Fluoridkonzentration von 10^{-2}m im Cytoplasma am stärksten angereicherte Zwischenprodukt 2-Phosphoglycerinsäure. Durch einen langen Kontakt zwischen der DC-Platte und der Photoplatte konnten weitere, nur in Spuren vertretene, Intermediäre nachgewiesen werden. Auch bei den Disacchariden sind Derivate erkennbar, die aber keine 2-Phosphoglycerinsäure oder Monophosphate sind. Im chromatographischen Trennverfahren verhalten sie sich ähnlich den Phosphaten und werden an dem Anionenaustauscher DEAE-Cellulose zurückgehalten. Mechery[101)] konnte durch Spaltung des Derivats (Nr. 10 der Abb. 17) aus der Laktoseinkubation mit saurer Phosphatase und durch Inkubationsversuche mit ^{32}P wahrscheinlich

machen, daß es sich um ein Laktosephosphat handelt. Bei niederen Fluoridkonzentrationen (10^{-5}m) ist die Menge an 2-P-Glycerinsäure nur unwesentlich erhöht. Es können jedoch eine Reihe weiterer Metaboliten wie PEP, die Monophosphate, F-1,6-P_2, Milchsäure und Glycerin nachgewiesen werden. Da die Intermediären bei nicht mit Fluorid behandelten Zellen identisch mit denen bei niederen Fluoridkonzentrationen waren (Abb. 18), wurde auf eine Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

Abb. 15 : Einfluß von NaF verschiedener Konzentrationen auf die Glukose-Aufnahme

Die Zellen waren in einem Medium mit 1% Glukose gewachsen. Nach dem Resuspendieren in zuckerfreiem Medium wurde der Versuch durch die Zugabe von radioaktivem Substrat gestartet.

Eingesetzt wurde Glukose-C14:

9×10^{-4}m; 0,027 mCi/mMol

Proben zu je 3 ml (= 1 mg Trockengewicht) wurden nach 1/2, 2, 4, 6, 8, 10, 20 und 30 Minuten entnommen.

Die Proben wurden abfiltriert, gewaschen und die Radioaktivität im LSC gemessen.

Abb. 16 : Intrazellulärer Zustand der aufgenommenen Glukose in Gegenwart verschiedener NaF-Konzentrationen

Die Zellen wurden in einem 1% Glukosemedium angezogen. Nach dem Resuspendieren in zuckerfreiem Medium wurde der Versuch durch die Zugabe von radioaktivem Substrat gestartet.

Eingesetzt wurde Glukose-C14:

9×10^{-4}m; 0,162 mCi/mMol

Proben zu je 3 ml (= 1 mg Trockengewicht) wurden nach 30 Minuten entnommen.

Die Proben wurden abfiltriert, gewaschen und extrahiert und der Extrakt chromatographiert - wie in Kap. 2.6. und 2.7. beschrieben -.

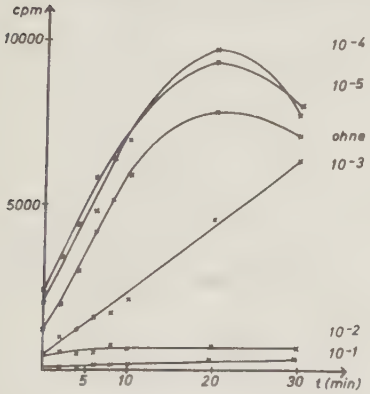
Belichtungszeit der Autoradiographie: 7 Tage

Zuordnung der Intermediäre: S. 43

Einfluß von NaF

Stamm 275 Glukose gewachsen

spez. Aktivität der Glukose : 0,027 mCi/mMol
Konzentration " " : 9 x 10-4 Mol



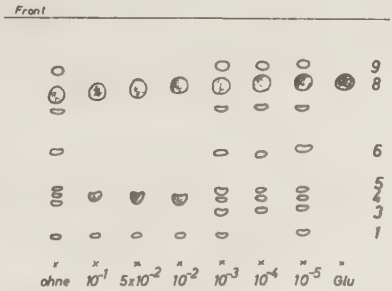
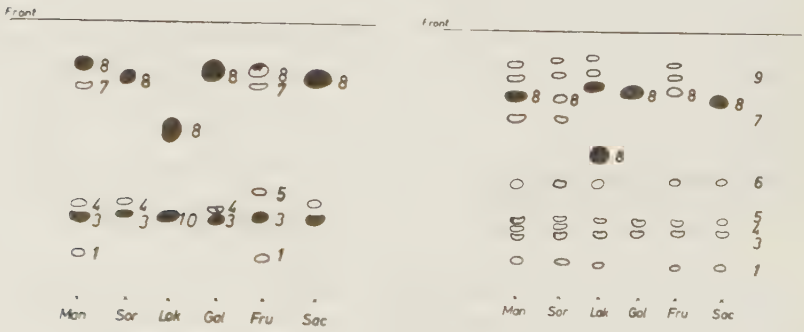


Abb. 17 und 18 : Einfluß von 10^{-2}m NaF (Abb. 17) und 10^{-5}m NaF (Abb. 18) auf den Abbau verschiedener Zucker

Die Zellen wurden in Medien angezogen, die 1 % des zu testenden Zuckers enthielten (für Saccharosetests wurde in Glukose angezogen). Vor Versuchsbeginn wurde 15 Minuten lang mit der angegebenen Fluoridmenge vorinkubiert. Der Start erfolgte durch die Zugabe von radioaktivem Substrat. Nach 30 Minuten wurde die Inkubation durch Filtration beendet. Die Zellextraktion und Chromatographie wurde, wie in Methoden unter 2.6. und 2.7. beschrieben, ausgeführt. Durch eine Belichtungszeit von 20 Tagen konnten auch Spuren von Metaboliten nachgewiesen werden.

Substrate: Mannit-1-C14, Sorbit-C14, Galaktose-C14, Fruktose-C14, Laktose-1-C14, Saccharose (Glukose-C14)
(alle 9×10^{-4}m; 0,162 mCi/mMol)

Zuordnung der Intermediäre: S. 43



4.5. Kompetitive Hemmung der Aufnahme

Vergleicht man die Inhibitionsraten beim Hexosentransport (Tab. 5) mit denen beim Hexittransport (Tab. 3), so ist der Transport von Fruktose, Glukose und α-Methylglukose als äußerst spezifisch zu bezeichnen. Von den aufgeführten Hexosen, Pentosen oder Polyolen erreicht - mit Ausnahme von 2-Desoxyglukose beim Glukosetransport - keine eine Inhibitionsrate von 20%. Etwas unerwartet ist auch die fehlende Konkurrenz zwischen dem Glukose- und α-Methylglukosetransport.

4.6. Rücktransport von α-Methylglukose durch die Zugabe eines zweiten Substrats

Die Abb. 19 gibt die Werte wieder, die gemessen wurden, wenn im Glukosemedium gewachsene Zellen zunächst mit radioaktiver α-Methylglukose inkubiert und dann ein Überschuß an nichtmarkiertem Substrat zugesetzt wurde. Es war zwar ein Rückfluß von bereits intrazellulär angesammeltem Substrat meßbar, doch erfolgte dieser Austausch viel langsamer als dies bei einer echten Konkurrenz um den Transport geschieht (s. Abb. 12 b und 12 d 2-Desoxysorbit durch Hexite und 12 a und 12 c Xylit durch Hexite). Es ist also keine echte Konkurrenz von α-Methylglukose mit Galaktose und Glukose um das Transportsystem nachweisbar.

Tab. 5 : Aufnahme von Glukose-C14, Fruktose-C14 und α-Methylglukose-C14 in Gegenwart eines zweiten Zuckers oder Polyols

Die Zellen wurden in Fruktose oder Galaktose bis zur mittleren log-Phase angezogen und in zuckerfreiem Medium resuspendiert.

3 ml Proben enthielten:

Zellen (333 µg/ml), CAP (33 µg/ml), nicht radioaktiven Zucker ($5x10^{-2}$m) und Glukose-C14, Fruktose-C14 ($5x10^{-4}$m; 0,162 mCi1/mMol) bzw. Methyl-(α-Glukose-C14) ($5x10^{-5}$m; 3,8 mCi/mMol)

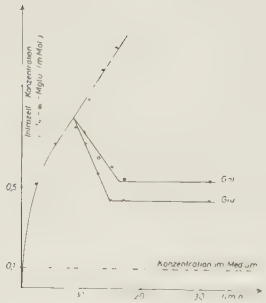
Die Zuckeraufnahme wurde bei Fruktose und α-Methylglukose nach 20 Minuten bzw. bei Glukose nach 5 Minuten Inkubationszeit durch Filtration abgestoppt, die Filter gewaschen und die aufgenommene Radioaktivität im LSC gemessen.
Die Menge an radioaktiven Zuckern, die in Abwesenheit von unmarkierten Zuckern aufgenommen wurde, wurde als Standard-Aufnahme (100%) festgesetzt.
Die Aufnahme in Gegenwart eines unmarkierten Zuckers wurde als Prozent von diesem Wert berechnet.

unmarkierter Zucker (5 x 10^{-2}m)	radioaktiver Zucker		
	Fruktose-C14	Methyl-(α-Glukose-C14)	Glukose-C14
m-Erythrit	50	55	81
Ribit	90	87	90
Xylit	79	68	85
D-Arabit	91	94	103
D-Arabinose	79	97	97
D-Glukose	37	118	9
α-Methyl-glukose	88	19	68
D-Sorbit	90	72	81
2-Desoxy-D-Sorbit	63	100	88
D-Mannit	79	70	80
D-Galaktose	65	23	89
D-Fruktose	7	95	65
m-Inosit	94	97	101
3-O-Methyl-glukose	-	-	84
2-Desoxy-glukose	-	-	4

Abb. 19 : Rücktransport von α-Methylglukose nach Zugabe eines zweiten Substrats

Die Zellen wurden mit radioaktiver Methyl-(α-Glukose-C14) ($5x10^{-5}$m; 3,8 mCi/mMol) inkubiert, nach 9 Minuten ein Überschuß an unmarkierter Glukose bzw. Galaktose zugesetzt.

0,4 ml Proben, die 0,53 mg Zellen (Trockengewicht) und 13,3 µg CAP enthielten, wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen, abfiltriert, gewaschen und die Aktivitätsbestimmung im LSC durchgeführt.



4.7. Diskussion

Erste vorläufige Untersuchungen deuten darauf hin, daß neben Sorbit und Mannit auch Glukose und Fruktose von PEP-abhängigen Zuckerphosphotransferase-Systemen transportiert und phosphoryliert werden, denn mit toluolbehandelten Zellen hatten diese Zucker in Gegenwart von PEP und NaF die höchsten Phosphorylierungsraten. Beide Transportsysteme sind als äußerst stereospezifisch anzusehen. Für Galaktose ist - ebensowenig wie für ß-Thiomethylgalaktosid - eine Aktivität mit PEP und 2-P-Glycerinsäure nachweisbar.

Wurden intakte Zellen in Gegenwart von 10^{-2}m NaF mit den Disacchariden Laktose und Saccharose inkubiert, so konnten intrazelluläre anionische Derivate nachgewiesen werden. Auf Grund des chromatographischen Verhaltens und der Markierungsversuche mit ^{32}P handelt es sich wahrscheinlich um Disaccharidphosphate. Die Monosaccharide wurden in Anwesenheit hoher Fluoridkonzentrationen bis zur 2-Phosphoglycerinsäure abgebaut. In Zellen, die mit 10^{-5}m NaF versetzt waren, konnten beim Abbau aller Zucker die gleichen Metaboliten wie in den ungehemmten Ansätzen festgestellt werden.

F-1,6-P_2 war als Zwischenprodukt bei der Fermentation von Sorbit, Mannit, Glukose, Fruktose, Laktose und Saccharose erkennbar. Da nur der Embden-Meyerhof-Weg über diese Stufe führt, ist dieser Abbauweg für diese Substrate sehr wahrscheinlich. Für Sorbit, Mannit und Glukose können damit die Ergebnisse von Dallmeier[4)] bestätigt werden.

Durch diese Methode konnte auch bewiesen werden, daß durch den Einsatz von NaF kein anderer, in ungehemmten Zellen unbedeutender, Abbauweg erzwungen wird. Würde das Substrat nach einem anderen Weg abgebaut, so müßten weitere Intermediäre im Autoradiogramm erkennbar sein. Mit der dünnschichtchromatographischen Trennung der Metaboliten und der Autoradiographie kann also auch untersucht werden, ob durch ein Reagenz ein zusätzlicher Abbauweg Bedeutung für den Stoffwechsel gewinnt.

Betrachtet man die Resultate, die beim Einsatz von Glukose-Analoga erzielt wurden, so können die Ergebnisse aus dem Einsatz von Hexit-Analoga bestätigt werden. Analoga sind für das äußerst stereospezifisch arbeitende PEP-abhängige Phosphotransferase-System nur sehr bedingt verwendbar.

Van Denmark und Plackett[102] haben bei Mycoplasma eine fast 100%-ige Inhibition der Aufnahme von α-Methylglukose in Gegenwart eines nur 10-fachen Glukoseüberschusses gemessen. Ein 90%-iger Verlust von intrazellulärem α-Methylglukosephosphat trat innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe einer 10-fachen Menge an Glukose ein. Außerdem war eine hohe Phosphorylierungsaktivität mit PEP in Gegenwart von NaF festzustellen. Es muß aber eingeschränkt werden, daß neben der von PEP verursachten Phosphorylierungsaktivität auch für ATP eine gleichgroße Aktivität gemessen werden konnte, die von den Autoren jedoch nicht weiter diskutiert wurde. Ohne Kommentar geben Egan und Morse[103] die Aufnahmeraten für α-Methylglukose und Glukose wieder,

die für das Analogon nach 40 Minuten 14 µMol/g Zellen, für Glukose dagegen 230 µMol/g Zellen betrug. Dies sind aber Werte, die mit den von uns für beide Substrate gemessenen Werten vergleichbar sind.

Vielleicht haben viele Autoren die Unzulänglichkeit der Verwendung von Analoga bei so spezifischen Reaktionen wie dem Transport eingesehen und haben stillschweigend auf deren Einsatz verzichtet. Jedenfalls gibt es in der neueren Literatur keine weiteren Arbeiten, die bei einem PTS-System Stoffwechsel und Transport durch den Einsatz von solchen Analoga entkoppeln.

Eine Alternative dazu bietet die Isolierung von Mutanten, die auf Grund eines Blocks im Stoffwechsel oder im Transportsystem eine ausführliche Charakterisierung des Transports zulassen.

5. Mutanten

5.1. Vorbemerkungen

Transport-Mutanten bei Streptokokken wurden bisher nur von zwei Arbeitskreisen beschrieben.
Die eine Gruppe, McKay et al.[55], untersuchte den bei anderen Bakterien am ausführlichsten charakterisierten Laktosetransport. Um den Transport vom Stoffwechsel zu trennen, stand ihr ein Substrat (ß-Methyl-Thiogalaktosid) zur Verfügung, das eine sehr hohe Affinität zum Laktosetransportsystem besitzt, aber auf Grund einer Verknüpfung über ein Schwefelatom nicht von der ß-Galaktosidase gespalten werden kann. So begnügte sie sich mit wenigen Mutanten, die sie ohne gezielte Mutagenese erhielt.

Der Versuch der anderen Arbeitsgruppe[81], mittels Mutanten die Regulation des Leloir-Wegs aufzuklären, scheiterte daran, daß es ihr nicht gelang, für jeden Reaktionsschritt Mutanten zu isolieren.

Eine Erfolgsaussicht bei der Suche nach Mutanten gründete sich auf die Tatsache, daß es Gehring[8] gelungen war, aus Zahnplaques von Menschen drei Stämme zu isolieren, die in allen biochemischen und serologischen Eigenschaften dem Stamm 275 ähnlich waren. Allerdings waren sie unfähig, innerhalb von 5 Tagen aus Sorbit Säuren zu bilden. Als Phänotyp bei der Isolierung bot sich daher an, solche Kolonien näher zu untersuchen, die die angebotene Hexite und Zucker nicht zu Säuren abbauen konnten.

Um eine sinnvolle Mutantenisolierung betreiben zu können, mußte danach getrachtet werden, folgende Forderungen zu erfüllen:

1) Eine Indikatorplatte sollte vorhanden sein, die eine deutliche Unterscheidung zwischen säurebildenden und nichtsäurebildenden Kolonien erlaubt.

2) Ein mutagenes Agens sollte eingesetzt werden, das möglichst viele Mutationen bei Strep. mutans verursacht.

3) Eine Anreicherung von Mutanten sollte erreicht werden, um deren Isolierung zu erleichtern.

Da eine möglichst große Zahl an Mutanten charakterisiert werden sollte, mußten einfache und schnelle Methoden gefunden werden, die es ermöglichen, die Ursache dafür zu finden, warum eine Mutante ein bestimmtes Substrat nicht zu Säuren abbauen kann.

5.2. Indiaktor-Agar-Platten

Um das Säurebildungsvermögen der Mutanten zuverlässig festzustellen, war es notwendig, einen spezifischen Indikator zu verwenden. Bei E. coli ist es eine Standard-Methode, dazu einen Mischindikator von Eosin und Methylenblau zu verwenden. Versuche mit einem Vollmedium, dem diese Substanzen zugesetzt waren, zeigten, daß durch die Gegenwart dieser Chemikalien ein Wachstum für Strep. mutans nicht mehr

möglich war. Auch auf Agar-Platten war keine Kolonienbildung erkennbar.

Gehring[104] hat für Strep. mutans ein Phenolrot-Flüssigmedium (Difco) vorgeschlagen. Durch Dallmeier[105] war jedoch festgestellt worden, daß bei Phenolrot-Agar-Stichkulturen, die durch Zusatz von Agar zum Phenolrot-Flüssigmedium hergestellt worden waren, auch ohne Zugabe irgendwelcher Zucker als Kohlenstoffquelle ein Farbumschlag registriert werden konnte. McKay[55] verwendete bei Strep. lactis als Indikator Bromkresolpurpur (p_H = 5,2 - 6,8; gelb-purpur), um Galaktose- bzw. Laktose-negative Bakterien herauszufinden. Kolonien, die den angebotenen Zucker fermentieren konnten, wurden durch die dabei gebildeten Säuren gelb gefärbt, während nichtsäurebildende Kolonien im Gegensatz dazu weiße Kolonien bildeten. Voraussetzung war aber, daß durch ein reiches Nährstoffangebot, ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle, ein - wenn auch nur geringes - Wachstum möglich war. Um dies für Strep. mutans zu erreichen, wurde ein Vollmedium mit Fleisch- und Hefeextrakten ausgewählt.

Mäkinen[106] fand für Strep. mutans, daß ein reichliches Angebot an Proteinen beim Fehlen eines Zuckers eine Induktion von aminopeptidasen-ähnlichen Enzymen bewirkt. Auf diese Weise ist eine geringe Vermehrung dieser Bakterien möglich.

5.3. Mutanten durch UV-Bestrahlung

Die Behandlung mit UV-Strahlen war trotz mehrfacher Wiederholung der Mutagenese-Versuche nicht erfolgreich. Es konnten, obwohl etwa 15000 Einzelkolonien nach der Bestrahlung auf Indikatorplatten ausgespatelt wurden, keine Mutanten entdeckt werden. Ein gewichtiger Nachteil dieses Verfahrens ist das Fehlen einer Anreicherungsmethode speziell für Streptokokken. Eine Anreicherung der nicht wachsenden Bakterien durch Abtöten der normal fermentierenden mittels der bei Enterobakterien so erfolgreichen Penicillinbehandlung erwies sich als erfolglos, da sich dieser Stamm - wie die meisten Streptokokken der Mundhöhle - als resistent gegen Penicillin erwies. Deshalb wurde eine besonders modifizierte Methode der chemischen Mutagenese erarbeitet.

5.4. Die Mutagenese mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG)

E. Cerdá-Olmedo und P.C. Hanawalt[107)108)] haben sehr ausführlich den Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG) bei E. coli untersucht und folgenden Wirkungsmechanismus postuliert.

Bei einem p_H über 5 tritt eine Zersetzung der Substanz unter Abspaltung von Diazomethan auf. Daher wirkt NNMG hauptsächlich als alkylierendes Agenz auf Proteine und auf die Basen der DNA. Diese Schäden können durch den gleichen Mechanismus, wie er für die Dunkelreaktivierung (dark repair) formuliert wurde, ausgebessert werden. Voraussetzung

dafür ist, daß die Reparatur vor der DNA-Replikation erfolgt, so daß sich der Schaden als Mutation nicht manifestieren kann. Schäden, die nahe am Replikationspunkt liegen, werden kaum vor der Replikation ausgebessert, entfernterliegende dagegen können sich nicht so leicht manifestieren.

Um eine große Anzahl von Stoffwechselmutanten zu erzeugen, wurde folgendes Mutageneseverfahren erprobt:

1) Die Bakterien werden solange mit dem NNMG in einem Sorbitmedium behandelt, bis nur sehr wenige Zellen überleben (Überlebensrate: 10^{-3} bis 10^{-4}). Eine hohe Abtötungsrate ist wichtig, da an einer Streptokokkenkette eine Vielzahl von Individuen vorhanden ist. An einer Kette sollte aber nur ein Bakterium überleben, da sich auf der Platte sonst eine Mischkolonie ausbilden würde.

2) Nach der Mutagenese läßt man die Bakterien wieder bis zur mittleren log-Phase anwachsen. Wählt man als Kohlenstoffquelle wieder Sorbit, so werden sich alle diese Zellen schnell vermehren, die dieses Substrat fermentieren können, auch wenn sie einen Defekt in einem anderen Zuckerabbau aufweisen. Diejenigen jedoch, die im Sorbit-Metabolismus beeinträchtigt sind, wachsen nicht oder nur sehr langsam.

3) Wiederholt man die Mutagenese, so treten in den Zellen, die Sorbit normal fermentieren, leichter neue Mutationen auf, da in diesen Zellen eine schnellere DNA-Replikation abläuft. Sehr häufig

werden auch Letalmutationen sein. Bakterien, die kaum wachsen, verdoppeln auch die DNA nur langsam, d.h. in diesen Zellen werden sich kaum weitere Mutationen manifestieren.

4) Die überlebenden Zellen werden wieder in einem Sorbitmedium angezogen. Es gilt das in 2) und 3) Festgestellte, d.h. bei einer nochmaligen Wiederholung der Mutagenese werden wieder Sorbit-negative Mutanten entstehen. Die bei der ersten bzw. zweiten Mutagenese erzeugten, Sorbit nicht metabolisierenden, Bakterien überleben mit großer Wahrscheinlichkeit. Wird eine hohe Abtötungsrate bei der Mutagenese angewandt, so werden relativ viele Sorbit nicht abbauende Zellen überleben, jedoch nur wenige fermentierende. Wird die Bakterienkultur ausgeplattet, so müssen viele Sorbit-Mutanten auch ohne einen gesonderten Anreicherungsschritt vorhanden sein.

Sollen hauptsächlich Mannit-Mutanten erzeugt werden, so muß während der ganzen Mutagenese statt Sorbit Mannit als Kohlenstoffquelle eingesetzt werden.

5.5. Das Säurebildungsvermögen der Mutanten

In der Tab. 6 a - c wird das Säurebildungsvermögen der bisher rein isolierten Mutanten aufgezeigt. Die Mutanten 1 bis 54 wurden von Sorbit-Platten isoliert, nachdem das im vorhergehenden Kapitel beschriebene Mutageneseverfahren mit Sorbit als Kohlenstoffquelle angewandt worden war. Von den 16 Mutanten zeigten nur 2 nach einer fünftägigen Bebrütung eine schwache Verfärbung der Platte an, das Größenwachstum aller Kolonien auf der Platte war stark vermindert und keine der Kolonien zeigte eine Gelbfärbung.

Die Mutanten, die mit den Nummern 60 - 136 bezeichnet sind, wurden gefunden, als Mutationen im Mannit-Metabolismus erzeugt werden sollten. Es wurde deshalb in einem Mannitmedium angezogen und nach der letzten Mutagenese auf einer gleichen Anzahl von Sorbit- und Mannit-Indikatorplatten ausgespatelt. Auf den Mannit-Platten wurden keine Mannit-negativen Kolonien entdeckt; doch waren von den Sorbit-Platten eine Reihe von Sorbit$^-$-Mutanten isolierbar. Von einer Sorbit-Platte konnte zufällig die Mutante 115 isoliert werden. Sie ist die einzige bisher gefundene Mannit$^-$-Mutante. Sorbit kann sie zu Säuren abbauen. Auffallend ist bei diesen Mutanten der große Anteil an Mehrfach-Mutationen, d.h. mehrere Zucker oder Hexite können nicht zu Säuren fermentiert werden.

Unter diesen Mutanten sind auch einige (123, 128 und 136), die mit keinem der getesteten Substrate Säuren bilden können. Obwohl auch Saccharose nicht zu Säuren

abgebaut werden kann, was sich auch in einem winzigen Kolonienwachstum äußert, umhüllen sich diese Kolonien mit einem großen Tropfen eines sehr dünnflüssigen, extrazellulären Polysaccharides, wenn diese Mutanten auf 1% bzw. 5% Saccharose-Agar-Platten ausgestrichen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es gelungen ist, für alle getesteten Zucker und Zuckeralkohole Mutanten zu finden, die angebotenes Substrat nicht zu Säuren abbauen konnten.

Da die extrazelluläre Polysaccharidbildung durch Streptokokken eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Karies spielt, wurde der Typ des Polysaccharides auf 5% Saccharose-Agar-Platten in der letzten Spalte der Tab. 6 a - c erwähnt, wenn er sich von dem des Stamms 275 wesentlich unterschied. Gehring[109)] konnte Strep. mutans mit Eigenschaften ähnlich dem Stamm 275 aus Zahnplaques isolieren, die ebenso unterschiedliche Typen der Polysaccharidbildung zeigten; u.a. traten häufig Mutanten auf, die auffallend weiße Kolonien bildeten.

Tab. 6 a - c : Säurebildungsvermögen und Koloniewachstum bei Mutanten vom Stamm 275

Eine Einzelkolonie wurde 12 - 18 Stunden in einem Sorbitmedium angezogen und auf Indikatorplatten mit 1% des angegebenen Zuckers und 0,0004 % Bromkresolpurpur ausgestrichen und unter halbanaeroben Bedingungen (Exsikkator + Kerze) bei 37° C 5 Tage bebrütet. Es wurden folgende Symbole festgestellt:

++ : Wildtyp, zeigt nach eintägiger Bebrütung eine Gelbfärbung der Platte; nach 3 Tagen haben sich große, zitronengelbe Kolonien gebildet.

+ : Nach 2 - 3 Tagen Gelbfärbung der Platten; die Kolonien erreichen erst nach 5 - 6 Tagen eine mit ++ Kolonien vergleichbare Größe, sind jedoch nicht so intensiv zitronengelb gefärbt.

(+) : Nach 2 - 3 Tagen Gelbfärbung der Platten; die Kolonien sind fast weiß, jedoch größer als die der nicht säurebildenden Mutanten.

(-) : Nach etwa 3 - 4 Tagen Gelbfärbung der Platten; die Kolonien sind sehr klein und farblos.

- : Auch nach 5-tägiger Bebrütung keine Verfärbung der Platte; es bilden sich winzige, farblose Kolonien.

n.g. : = nicht gewachsen; auch nach 5 Tagen sind keine Kolonien auf den Indikatorplatten erkennbar.

PS : = Polysaccharid

Mutante	Sorbit	Mannit	Mannose	Galaktose	Laktose	Glukose	Fruktose	1% Saccharose	5% Saccharose
1	-	++	+	++	++	++	++	++	
2	-	++	++	+	++	++	++	++	
3	-	++	+	+	++	++	+	n.g.	n.g.
4	-	++	++	+	++	++	+	++	
5	-	++	+	+	++	++	+	++	
6	-	++	++	(+)	++	++	-	n.g.	n.g.
7	(-)	+	+	(+)	(+)	+	(+)	++	sehr viel PS
8	-	+	(+)	(+)	+	+	(+)	++	
9	(-)	++	(-)	(-)	+	++	-	++	sehr viel PS
12	-	++	++	+	++	++	++	++	
13	-	++	++	+	++	++	++	++	
14	-	++	+	++	++	++	++	++	
16	-	++	++	++	++	++	++	++	
18	-	++	-	(+)	++	++	(+)	n.g.	
20	-	++	+	n.g.	++	+	+	++	
54	-	++	+	(+)	+	++	(-)	n.g.	

Tab. 6 a

Mutante	Sorbit	Mannit	Mannose	Galaktose	Laktose	Glukose	Fruktose	1% Saccharose	5% Saccharose
60	++	++	-	(-)	++	++	++	++	wenig PS
64	-	++	++	++	++	++	n.g.	++	viel PS
73	++	++	++	++	++	++	++	++	wenig weißes PS
76	(-)	++	+	++	++	+	++	++	wenig weißes PS
81	-	++	(-)	-	++	++	++	++	viel PS
92	-	+	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	keine Säure viel PS
97	+	++	++	++	++	+	++	++	
106	(-)	++	++	+	++	++	++	++	wenig weißes PS
107	-	++	(-)	++	++	++	++	++	
108	+	++	++	+	++	++	(+)	-	keine Säure kein PS
109	+	++	++	(+)	++	++	++	+	
110	+	++	-	++	++	++	-	++	
111	-	+	+	-	+	+	+	++	
112	++	++	-	++	++	++	(-)	-	keine Säure
115	+	-	++	++	++	++	++	++	sehr viel PS

Tab. 6 b

Mutante	Sorbit	Mannit	Mannose	Galaktose	Laktose	Glukose	Fruktose	1% Saccharose	5% Saccharose
117	-	++	-	+	++	++	n.g.	+	
118	-	++	(+)	(-)	++	++	++	+	
119	(+)	++	+	-	-	++	++	+	
120	+	++	+	++	-	++	++	+	wenig PS
121	-	++	-	(-)	++	-	+	+	
123	-	-	-	-	-	-	-	-	keine Säure viel PS
124	(-)	++	+	(-)	++	++	+	+	
125	-	++	+	+	+	++	-	-	keine Säure sehr viel PS
126	-	(-)	+	n.g.	(-)	+	+	+	
128	-	-	-	-	-	-	-	-	keine Säure sehr viel PS
129	-	+	(+)	++	++	++	+	++	
130	+	++	+	n.g.	++	++	+	+	
134	-	++	(-)	-	++	++	++	+	
135	-	++	++	++	++	++	++	++	
136	-	-	-	-	-	-	-	-	keine Säure sehr viel PS

Tab. 6 c

5.6. Biochemische Charakterisierung der Mutanten

Da eine große Anzahl von Mutanten untersucht werden sollte, wurden einige Verfahren ausgewählt, die einen raschen Überblick über die Aufnahme und den Metabolismus des angebotenen Substrats geben sollten. Diese Ergebnisse sollten dann miteinander verglichen werden, um eventuelle Zuordnungen treffen zu können.

Auf Grund des Themas konzentrierte sich das Interesse auf Sorbit als Substrat. Deshalb wurden alle Mutanten unter den einheitlichen Bedingungen einer Anzucht in einem Sorbitmedium getestet. Vorversuche hatten ergeben, daß Sorbit-induzierte Stämme auch Fruktose und Galaktose in ausreichenden Mengen aufnehmen konnten, so wurde die Aufnahme dieser Substrate mitgetestet.

Die fünf anschließend beschriebenen Tests wurden möglichst alle mit einer Kultur vom gleichen Tag durchgeführt.

1) Ausstreichen der Bakterien auf Sorbit-, Fruktose- und Galaktose-Indikatorplatten.

   Es wurde das Säurebildungsvermögen und das Kolonienwachstum untersucht und gleichzeitig die Reinheit der Kultur kontrolliert.

2) Bestimmung der Aufnahmeraten dieser Substrate.

   Damit wurde die Fähigkeit, ein Substrat aufzunehmen, charakterisiert.

3) Untersuchung des intrazellulären Zustands des aufgenommenen Sorbits nach 30 Minuten Inkubationszeit.

   Dieser Versuch zeigte den Verlauf des Metabolismus an. Eine Anreicherung eines Metaboliten und das Fehlen aller darauffolgenden Zwischenprodukte des Abbauwegs wären ein Hinweis für einen enzymatischen Block im Stoffwechsel gewesen.

4) Bestimmung der Aktivität der PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase.

   Eine mögliche Ursache eines geringen Substratumsatzes könnte die Inaktivität dieses Sorbittransportsystems sein. Ein Ausfall in diesem System würde nur den Sorbit-Metabolismus betreffen.

5) Bestimmung der Aktivität der Sorbit-6-Phosphat-Dehydrogenase.

   Die Dehydrogenase ist das zweite Enzym, dessen Defekt speziell einen Abbau von Sorbit verhindern würde.

Abb. 20 a - c : Intrazellulärer Zustand des angenommenen Sorbits in den Mutanten

Die Mutanten wurden in einem 1% Sorbitmedium angezogen und mit Sorbit-C14 ($5x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol) 30 Minuten inkubiert.

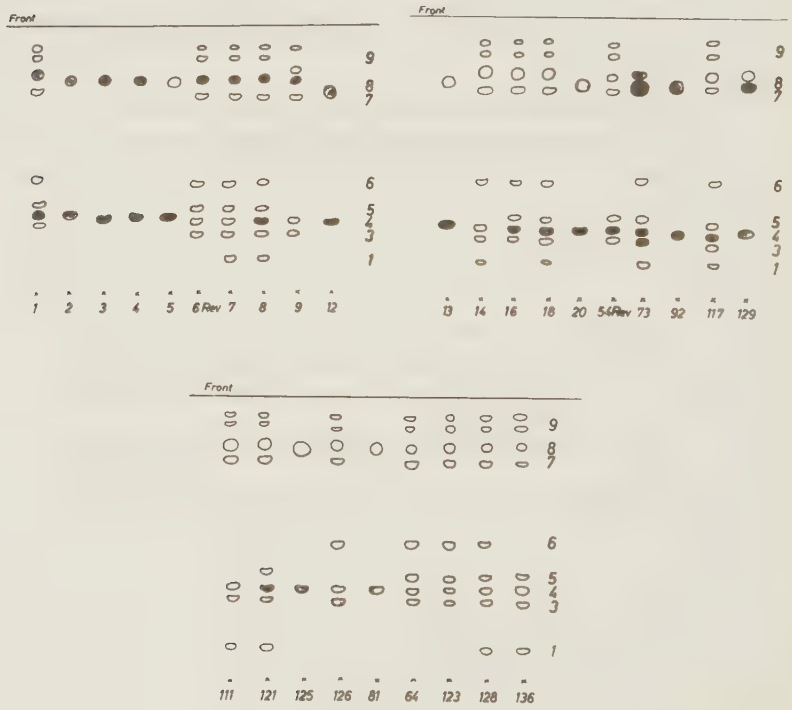
Die Ansätze von 0,8 ml enthielten:

Zellen (1,32 mg/ml) und CAP (33 µg/ml)

Die Bakterien wurden durch Filtration abgetrennt und extrahiert und chromatographiert, wie in 2.6. und 2.7. beschrieben.

Belichtungszeiten: ca. 14 Tage

Zuordnung der Intermediäre Seite 43



Tab. 7 - 9 : Biochemische Charakterisierung der Mutanten

Die Mutanten wurden in einem 1% Sorbitmedium 1-3 Tage angezogen und folgende Tests mit Zellen einer Kultur durchgeführt:

1) Ausstreichen auf Sorbit-, Fruktose- und Galaktose-Indikatorplatten, um das Säurebildungsvermögen und das Kolonienwachstum - wie in Tab. 6 a - c - zu charakterisieren. Gleichzeitig konnte damit die Reinheit der Kulturen kontrolliert werden.

2) Bestimmung der Aufnahmerate und des intrazellulären Zustands des aufgenommenen Substrats.

   Ansatz: Bakterien (1,32 mg/ml), CAP (33 µg/ml) und Sorbit-C14 oder Fruktose-C14 oder Galaktose-C14 (je 5×10^{-4}m; 0,162 mCi/mMol)

   Aufarbeitung wie in 2.17.1. beschrieben.

   Angabe der Radioaktivität des aufgenommenen Substrats in Cpm.

3) Bestimmung der Aktivität der PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase.

   Ansatz wie in 2). Zusätzlich wurden je Versuch 10 µl Toluol, 10^{-2}m NaF und 10^{-3}m PEP zugesetzt.

   Bestimmung der Umsatzrate wie in Kapitel 2.9.1. beschrieben. Angabe des Umsatzes in nMol gebildetes Sorbit-6-P/mg Trockengewicht x min.

4) Bestimmung der Aktivität der Sorbit-6-P-DH.

Ansatz: 2,5 ml Rohextrakt, 0,1 ml NAD^+ (50 µl Mol/ml), 0,2 ml Sorbit-6-P (90 µl/ml)

Messung der Extinktionsänderung bei 340 nm.

Angabe des Umsatzes in nMol umgesetztes S-6-P/mg Protein x min.

+) Umsatz in nMol gebildetes S-6-P/mg Trockengewicht x min.

++) Umsatz in nMol verbrauchtes S-6-P/mg Protein x min.

Mutante	2	3	4	5	6	12	13	14	20	54	81	92	125	129
Säurebildung mit Sorbit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aufgenom. Sorbit (Cpm)	1700	830	1000	4800	1800	2400	1600	1500	2000	1700	2300	1400	2500	5700
Aktivität des Sorbit-PTS +)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp	0	0	0	0
Säurebildung mit Fruktose	++	n.g.	+	+	n.g.	++	++	++	+	(-)	++	++	-	+
aufgenommene Fruktose (Cpm)	11100	5100	2400	5100	-	9400	10500	8000	5600	6900	9100	7200	7400	4700
Säurebildung mit Galaktose	+	+	+	+	(+)	+	+	++	n.g.	(+)	++	(+)	+	+
aufgenommene Galaktose (Cpm)	1400	980	220	3900	1900	2500	3100	5300	1200	800	4100	1000	2400	2400
Aktivität der Sorbit-6-P-DH ++)	0,85	0,57	-	-	-	0,95	0,5	-	0,25	-	-	-	-	0,1

Tab. 7: Mutanten der Klasse I

Mutante	1	7	8	9	64	76	118	124	126	134
Säurebildung mit Sorbit	-	(-)	-	(-)	-	(-)	(-)	(-)	-	-
aufgenommenes Sorbit (Cpm)	6800	6000	4400	2500	9000	6800	7800	8200	6300	5800
Aktivität des Sorbit-PTS +)	1,5	1,7	1,3	1,2	1,4	1,4	2,1	2,7	1,6	1,6
Säurebildung mit Fruktose	++	(+)	(+)	-	n.g.	++	++	+	+	++
aufgenommene Fruktose (Cpm)	7600	6400	6200	4100	5200	4600	4800	5200	4900	10200
Säurebildung mit Galaktose	++	(+)	+	(-)	++	++	(-)	(-)	n.g.	-
aufgenommene Galaktose (Cpm)	6100	3000	960	230	2800	3300	4000	2000	2900	2200

Tab. 8 : Mutanten der Klasse II

Mutante	73	97	109	113	117	119	130	14 Rev	18 Rev	54 Rev	275 Wildtyp
Säurebildung mit Sorbit	++	+	+	++	+	(+)	+	++	++	++	++
aufgenommenes Sorbit (Cpm)	6100	9800	6400	8100	9400	6300	5000	6900	4300	8300	6500
Aktivität des Sorbit-PTS +)	3,3	1,2	1,1	1,2	1,0	1,3	2,0	2,3	2,4	2,8	3,5
Säurebildung mit Fruktose	++	++	++	++	(+)	++	+	++	(+)	++	++
aufgenommene Fruktose (Cpm)	5200	4500	8900	7800	5400	5500	6500	8600	3400		8200
Säurebildung mit Galaktose	++	++	(+)	++	+	-	n.g.	++	(+)	(+)	++
aufgenommene Galaktose (Cpm)	3800	3700	1900	3500	2100	2600	660	5000	680	690	4800

Tab. 9 : Mutanten, die Sorbit zumindest langsam zu Säure abbauen bzw. spontane Revertanten, die die Fähigkeit Sorbit zu Säuren abzubauen, wieder erlangt haben und der Stamm 275 (Wildtyp)

Die Abb. 20 a - c zeigen den intrazellulären Zustand von aufgenommenem Sorbit nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Ein Teil der Mutanten weist nur unverändertes Substrat und ein Derivat auf, das als Sorbit-6-P identifiziert werden konnte, während bei den anderen Mutanten (nahezu) alle Metaboliten des normalen Stoffwechsels erkennbar sind.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde in den Tab. 7, 8 und 9 eine Einteilung nach verschiedenen Klassen vorgenommen.

Alle Mutanten, die ausschließlich Sorbit-6-P anreicherten, wurden der Klasse I zugeordnet. Dieser Klasse ist gemeinsam:

a) Keine der 14 Mutanten konnte Sorbit innerhalb von 5 Tagen zu Säuren abbauen.

b) Innerhalb von 30 Minuten wurde nur relativ wenig Sorbit aufgenommen. Obwohl auf Grund eines fehlenden Abbaus keine Endprodukte ausgeschieden worden waren, betrug die aufgenommene Menge nach 30 Minuten nur 800 - 2400 Cpm (2 - 6 nMol aufgenommenes Sorbit/mg Zellen (Trockengewicht)).

c) Eine Aktivität des PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase-Systems war nur bei einer der Mutanten in Spuren nachweisbar.

d) Die Aktivität der Sorbit-6-Phosphat-Dehydrogenase war bei allen getesteten Mutanten 1.0 und damit beträchtlich niederiger als beim Wildtyp (~7.0). Eine kritische Betrachtung dieser Aktivitäten

erfolgt in der Diskussion Kap. 5.8.

c) Spontane Rückmutationen waren sehr selten.

Die Stämme, die intrazellulär (fast) alle Metaboliten des Wildtyps aufwiesen, aber trotzdem auf den Indikatorplatten keinen oder nur einen sehr schwachen Farbumschlag verursachten, wurden in der Klasse II (Tab. 8) zusammengefaßt. Eine weitgehende Übereinstimmung konnte bei folgenden Punkten festgestellt werden:

a) Die eine Hälfte der 10 Mutanten konnte keine Säuren bilden (S^--Mutanten), die andere produzierte geringe Mengen an Säuren ($S^{(-)}$-Mutanten), die nach 3 - 4 Tagen zu einer Gelbfärbung der Indikatorplatten führten. Die Kolonien aller Mutanten dieser Klasse blieben sehr klein und farblos.

b) Nach 30 Minuten wurde teilweise sogar mehr Radioaktivität (als Maß für aufgenommenen Sorbit) gemessen als im Wildtyp. Es handelt sich aber nur um eine scheinbar höhere Aufnahmerate. Tatsächlich resultiert diese aus einer reduzierten Aufnahmerate und einem noch langsameren Abbau. Beweise dafür sind eine sehr geringe Säurebildung und eine winzige Kolonienform.

c) Eine Sorbitaufnahme durch ein PEP-abhängiges Sorbit-Phosphotransferase-System ist bei allen Mutanten vorhanden, wenn auch die Aktivitäten niedriger sind als beim Wildtyp.

d) Spontane Revertanten waren häufiger als bei Mutanten der Klasse I.

In der Tab. 9 sind die Ergebnisse der Tests bei einigen Mutanten vom Typ S^+ und S^{++}, deren Stoffwechseldefekt also im Abbau eines anderen Zuckers liegt, wiedergegeben. Außerdem wurden drei spontane Revertanten der Klasse I, die die Fähigkeit, Sorbit abzubauen wieder erlangt haben, und der Wildtyp, Stamm 275, getestet.

Ein Vergleich der Daten läßt folgende Verallgemeinerungen zu:

a) In allen Fällen sind die Metaboliten des Wildtyps nachweisbar. Die Revertanten haben die Fähigkeit, Sorbit über Sorbit-6-P hinaus abzubauen, wieder erlangt.

b) Die Mutante 73 und die Revertanten 14 Rev, 18 Rev und 54 Rev sind im Säurebildungsvermögen und in der Größe der Kolonien dem Stamm 275 ähnlich. Die Aktivitäten der PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase erreichen beinahe den Wert des Wildtyps.

c) Die Aktivität des Sorbit-PTS bei den Sorbit$^+$- und Sorbit$^{(+)}$-Mutanten ist deutlich geringer als bei den unter b) genannten.

Die Abb. 20 c enthält auch Darstellungen des intrazellulären Zustands aufgenommenen Sorbits bei den Mutanten 123, 128 und 136. Diesen Mutanten ist gemeinsam, daß sie mit keinem der getesteten Zucker Säuren bilden. Im Autoradiogramm sind (fast) alle Metaboliten des Wildtyps erkennbar. Die Untersuchungen dieser

Mutanten waren sehr schwierig, da bei den Mutanten 123 und 128 häufig spontane Revertanten auftraten. Bei der Mutante 136 dagegen wurden Revertanten nicht beobachtet. Da die Untersuchungen nicht abgeschlossen sind, wurde darauf verzichtet, sie einer vorhandenen Klasse zuzuordnen bzw. eine weitere Klasse vorzuschlagen.

Vergleicht man in den Tab. 7 - 9 die Aufnahmeraten für Fruktose und Galaktose und ihre Fähigkeit, die Substrate zu verwerten, so ist eine weitgehende Übereinstimmung darin festzustellen, daß eine verminderte Aufnahme sich meist auf eine reduzierte Fermentation und damit Säurebildung auswirkt.

5.7. Untersuchungen an den Stämmen 290, 407 und 431

Gehring[8)] hat neben einer Reihe von Stämmen, die Sorbit abbauen, drei Stämme isoliert, die in allen Eigenschaften mit dem besprochenen Stamm 275 übereinstimmen. Sie waren nur unfähig, Sorbit zu Säuren abzubauen, so daß auch nach fünftägiger Bebrütung die Farbe des Indikatormediums unverändert blieb. Die Untersuchungen dieser Stämme wurden durchgeführt, ehe es gelang, Mutanten vom Stamm 275 herzustellen. Sie ergänzen aber unsere Untersuchungen insofern, als Vergleiche angestellt werden können, ob bei den durch chemische Mutagenese erzeugten Mutanten und natürlich vorkommenden Stämmen auf Grund gleicher Defekte Sorbit nicht abgebaut werden kann.

In der Tab. 10 ist die Induktion der Transportsysteme für die Hexite dargestellt. Wurden die Stämme in einem Sorbit- oder Mannitmedium induziert, so war nach einer 30-minutigen Inkubation mit Sorbit eine Aufnahme von 10 bis 15 nMol/mg Zellen meßbar, d.h. die Aufnahme ist vergleichbar mit der in der Abb. 1 b dargestellten Aufnahme von Sorbit nach Anzucht des Stamms 275 in Galaktose. Sie ist jedoch nur 1/10 der Aufnahmerate nach Sorbit-Induktion.

Tab. 10 : Induktion der Aufnahme für die Hexite Sorbit und Mannit

Stamm 290, 407, 431 : S^- , M^+

Die Stämme wurden bis zur mittleren log-Phase in einer 1%-Zuckerlösung angezogen und mit Sorbit-C14 und Mannit-C14 der Konzentration 9 x 10^{-4} Mol und spez. Aktivität 0,027 mCi/mMol 30 Minuten inkubiert.

+ : Induktion nach Anzucht
o : keine Induktion
—— : nicht getestet

Stamm	290		407		431	
Substrat / Anzucht in	Mannit	Sorbit	Mannit	Sorbit	Mannit	Sorbit
Sorbit	+	0	+	0	+	0
Mannit	+	0	+	0	+	0
Ribose	0	0	—	—	—	—

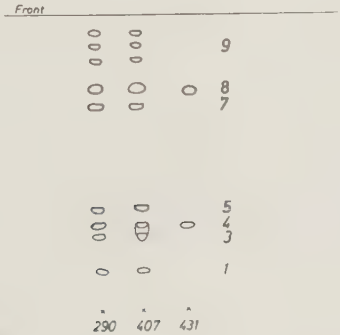
Diese Stämme wachsen nur sehr langsam im Sorbitmedium

In der Abb. 21 ist der intrazelluläre Zustand des aufgenommenen Substrats dargestellt. Die Stämme 290 und 407 zeigen die wichtigsten Metaboliten des Wildtyps, während beim Stamm 431 nur neben dem Substrat Sorbit das Phosphat (S-6-P) erkennbar ist.

Abb. 21 : Intrazellulärer Zustand des aufgenommenen Sorbits bei Stamm 290, 407 und 431 (Autoradiogramm)

Die Stämme wurden in einem 1% Sorbitmedium angezogen und mit Sorbit-C14 ($9x10^{-4}$m; 0,162 mCi/mMol) 30 Minuten inkubiert. Die durch Filtration abgetrennten Zellen wurden extrahiert und chromatographiert, wie in 2.6. und 2.7. beschrieben.

Belichtungszeit: 14 Tage
Zuordnung der Intermediäre: S. 43



In der Tab. 11 sind die Aktivitäten der Sorbit-6-Phosphat- und Mannit-1-Phosphat-Dehydrogenasen für die Sorbit-abbauenden Stämme 249 und 275 und die nicht abbauenden Stämme 290, 407 und 431 wiedergegeben.

Tab. 11 : Spez. Aktivitäten der Sorbit-6-P-DH und Mannit-1-P-DH der S^{++}-Stämme 249 und 275 und der S^{-}-Stämme 290, 407 und 431

Die Stämme wurden im Sorbit- bzw. Mannitmedium 12 - 16 Stunden angezogen und durch Behandlung mit Al_2O_3 im Homogenisator und durch Zenrifugation ein zellfreier Rohextrakt hergestellt.

Ansatz: Rohextrakt in Puffer 2,5 ml; NAD^+ (50 µMol/ml) 0,1 ml; Sorbit-6-P bzw. Mannit-1-P (90 µMol/ml) 0,2 ml

Messung der Extinktionsänderung bei 340 nm. Berechnung der Enzymaktivitäten aus der Änderung der Extinktion während der ersten 2 Minuten.

S : Sorbit
M : Mannit

Stamm	249		275		290		407		431	
Kulturmedium	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
Aktiv.S-6-P-DH (mU/mg)	7,1	4,5	7,0	7,4	7,2	6,9	4,7	6,4	2,2	2,0
Aktiv.M-1-P-DH (mU/mg)	5,7	30,5	19,8	32,2	48,5	57,5	35,8	40,8	20,0	21,0

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß der Stamm 431 nur eine geringe Sorbit-6-P-DH-Aktivität aufweist. Da auch dieser Stamm intrazellulär neben Sorbit ausschließlich Sorbit-6-P anreichert und der Dehydrogenasetest mit ungereinigtem Rohextrakt durchgeführt wurde, sind diese Ergebnisse mit denen der Mutanten der Klasse I vergleichbar. Der Stamm 431 kann der Klasse I zugeordnet werden.

Die Sorbit-6-P-DH-Aktivitäten der beiden anderen Stämme sind mit der des Stamms 275 bzw. 249 vergleichbar, die Sorbit abbauen können. Bei den Mutanten der Klasse II waren ebenfalls mit dem Stamm 275 vergleichbare Werte gemessen worden. Außerdem waren nach Sorbitzugabe intrazellulär die Metaboliten des normalen Abbaus bei der Klasse II und den Stämmen 290 und 407 erkennbar. Daher können diese beiden Sorbit$^-$-Stämme der Klasse II zugeordnet werden.

5.8. Diskussion

Mit dem hier erprobten Mutageneseverfahren wurde, ohne einen speziellen Anreicherungsschritt, eine relativ große Zahl von Stoffwechselmutanten erzeugt. Das Verfahren beruht darauf,

a) daß sich hauptsächlich nur dann Mutationen manifestieren, wenn eine schnelle DNA-Replikation erfolgt. Das ist der Fall, wenn die Zellen fermentieren und sich vermehren können.

b) daß Mutationen im Stoffwechsel des angebotenen Substrats eine Einstellung des Wachstums bewirken. Diese Mutanten werden daher nicht mehr weitermutiert.

c) daß durch mehrfache Wiederholung der Behandlung mit dem mutagenen Agens hauptsächlich die normal wachsenden Zellen abgetötet werden. Die nichtfermentierenden Mutanten überleben mit großer Wahrscheinlichkeit.

Durch die Wahl des Zuckers, der bei der Mutagenese zugesetzt wird, kann bestimmt werden, welche Mutanten hauptsächlich erzeugt werden sollen. Da Streptokokken einen großen Bedarf an essentiellen Aminosäuren haben und diese ebenso, wie die meisten Zucker, nur über spezifische Transportsysteme in das Cytoplasma gelangen, müßten auch solche Aminosäurentransportmutanten isolierbar sein. Ein synthetisches Medium ist die Voraussetzung für die Erkennung von Aminosäuren-Mutanten. Carlsson[110)] ist es gelungen, alle notwendigen Komponenten eines solchen

Mediums für Strep.salivarius festzulegen. Mit Aminosäuretransportmutanten wäre es möglich, den ebenfalls sehr interessanten Transport dieser Substanzen zu studieren. Dieser Transport wurde bisher nur bei Enterobakterien untersucht.

Wenn sehr viele solcher Mutanten zur Verfügung stehen, müßte es in genetischen Arbeiten auch möglich sein, eine Genkarte von Streptokokken mittels Transformation zu erstellen und die von Luginbuhl und Gooder[81)] begonnenen Arbeiten über die Regulation des Leloir-Weges fortzuführen.

Wurde dieses Mutageneseverfahren mit Sorbit als Kohlenstoffquelle angewandt, so war eine große Anzahl Sorbit-Mutanten isolierbar. Besonders häufig waren dabei Mutanten, die intrazellulär Sorbit-6-Phosphat anreicherten.

Eine Erklärung des Mißerfolges bei der Isolierung von Mannit-Mutanten könnte sein, daß sich intrazellulär auf Grund eines Enzymdefektes toxische Metaboliten (etwa Mannit-6-P) anreichern, wenn sie auf Indikatorplatten wachsen. Dies bewirkt, wie in Kap. 1.7. beschrieben, daß die Zellen nicht wachsen bzw. daß Lyse eintritt. Mutanten können bei der angewandten Isolierungsmethode nur dann erkannt werden, wenn zumindest winzige Kolonien gebildet werden. Dieser Erklärung widerspricht nicht die Isolierung der Mannit-Mutante 115. Vorversuche haben ergeben, daß bei dieser Mutante alle Metaboliten des Mannitstoffwechsels, wie sie beim Stamm 275 auftreten, vorhanden sind. Sie reichert also kein Mannit-1-P an. Eine andere Erklärung dafür, daß Mannit-

Mutanten selten zu finden sind, könnte sein, daß die Gene des Mannit-Transports bzw. Metabolismus sehr nahe an einem lebenswichtigen Gen liegen. Mutationen in diesem Bereich wären deshalb letal.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß durch chemische Mutagenese Mutationen im Transport oder Metabolismus von Sorbit, Mannit, Mannose, Galaktose, Laktose, Glukose, Fruktose und Saccharose erzeugt werden konnten.

Auf Grund des Säurebildungsvermögens mit den acht getesteten Zuckern konnten drei Gruppen von Mutanten angenommen werden: Die Gruppe mit Einzelmutationen, mit Mehrfachmutationen und die kleine Gruppe von Mutanten, die keines der getesteten Substrate fermentieren konnte. Bei den Einzelmutationen sind besonders die Sorbit-negativen, aber Mannit-positiven interessant, denn sie geben einen weiteren eindeutigen Beweis dafür, daß die beiden Substrate unabhängig voneinander aufgenommen und bis zur Stufe des Fruktose-6-P fermentiert werden. Da die Gruppe der Mehrfachmutationen nicht umfangreich genug ist und der Metabolismus der einzelnen Substrate noch nicht verfolgt wurde, lassen sich Enzymdefekte, die Blocks im Abbau verschiedener Substrate verursachen, nicht erkennen. Die Mutanten der dritten Gruppe, die unfähig sind, irgendeines der angebotenen Substrate zu Säuren abzubauen, haben wahrscheinlich als gemeinsame Ursache eine Mutation im Transportsystem. So wurden für das PEP-abhängige Zucker-Phosphotransferase-System bei einer Reihe von Bakterien[27)28)29)30)] solche Mutanten isoliert,

denen die zuckerunspezifischen Komponenten HPr bzw. Enzym I des PTS fehlten. Die Untersuchungen an den so verschiedenartigen Mutanten können noch nicht als abgeschlossen gelten.

Von größtem Interesse für die Arbeit war eine ausführliche Charakterisierung der Sorbit nicht abbauenden Mutanten vom Stamm 275. Auf Grund des Schicksals, das aufgenommener Sorbit bei den einzelnen Mutanten erleidet, konnte eine Untergliederung dieser Sorbit$^-$-Mutanten in zwei Klassen vorgenommen werden.

Eine wertvolle Ergänzung dazu waren die Ergebnisse, die bei den als Sorbit-negativ isolierten Stämmen 290, 407 und 431 aufgezeigt werden konnten. Sie erlauben eine Zuordnung dieser Stämme zu den beiden Klassen.

In der Klasse I sind die Gründe, warum Sorbit nicht abgebaut werden kann, relativ leicht zu erkennen. Diesen Mutanten fehlt zum einen das PEP-abhängige Sorbit-Phosphotransferase-System und zum anderen zeigen sie nur eine sehr geringe Aktivität der Sorbit-6-Phosphatdehydrogenase. Für enzymatische Bestimmungen der Sorbit-6-P-DH standen nur ungereinigte, zellfreie Extrakte mit niedrigen Konzentrationen an löslichen Proteinen zur Verfügung, da für den Zellaufschluß wegen des geringen Wachstums nur wenig Zellmaterial gewonnen werden konnte. Die nach der Zugabe von Sorbit-6-P gemessenen Extinktionsänderungen innerhalb von 2 Minuten waren sehr gering ($E_{340/2\ min}$ = 0,005 - 0,015). Solche minimalen Extinktionsänderungen können auch durch

Fremdaktivitäten hervorgerufen werden und liegen außerdem nahe an der Nachweisgrenze. Es darf daher angenommen werden, daß der Umsatz der Sorbit-6-P-DH in diesen Mutanten unbedeutend ist. Ein weiterer Beweis für eine sehr geringe Aktivität ist die intrazelluläre Anreicherung von Sorbit-6-P.

Welche genetische Ursache diese beiden Defekte haben, kann noch nicht endgültig angegeben werden. Es ist aber sicher nicht zufällig, daß beide Aktivitätsverluste gemeinsam auftreten. Bei spontanen Revertanten (14 Rev, 18 Rev und 54 Rev) wurden beide Enzyme gleichzeitig wieder aktiv.

Nach dem bisherigen Wissensstand über das PEP-abhängige Zucker-Phosphotransferase-System (Kap. 1.3. und 1.4.) muß die Unfähigkeit, Sorbit aufzunehmen, bei diesen Mutanten durch den Ausfall des stereospezifischen Enzym II-Komplexes bewirkt werden. Dieses Enzym II muß ebenso wie die Sorbit-6-P-Dehydrogenase induziert werden. Es liegt daher nahe, daß beide Enzyme nebeneinander liegen und gemeinsam induziert werden.Durch eine Mutation in den Genen selbst könnte bewirkt werden, daß ein inaktives Enzym entsteht. Es ist aber auch denkbar, daß die beiden Gene zu einem Operon gehören und durch eine Mutation in die Regulation der Genaktivität eingegriffen wird. Genetische Arbeiten könnten daher interessante Aufschlüsse über die Kontrolle des Zuckerstoffwechsels geben.

Die Ursachen, die dazu führen, daß Sorbit trotz reichlichen Substratangebotes und einer gut nach-

weisbaren Aktivität der PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase nicht in einem ausreichenden Maß von den Mutanten der Klasse II fermentiert werden kann, können nach dem Stand der Untersuchungen nicht erkannt werden. Es kann sich um ein Enzym handeln, das auf Grund einer geringen Aktivität den Substratumsatz erheblich reduziert.

Es wäre aber auch denkbar, daß das Säurespektrum auf Grund einer Änderung der Enzymaktivität eine andere Zusammensetzung erhielt. So konnten Demko et al.[111)] bei Strep. lactis zeigen, daß zwei spontane Transport-Mutanten, die Laktose nur mit geringer Rate aufnehmen und nur langsam abbauen konnten, dieses Substrat hetero-fermentativ nach dem Embden-Meyerhof-Weg zu Essigsäure, Ameisensäure und Äthanol auf Kosten der Milchsäure abbauen. Als Ursache für diese Veränderungen im Säurespektrum nehmen sie an, daß F-1,6-P_2 die Laktosedehydrogenase reguliert. Eine geringe intrazelluläre Konzentration an F-1,6-P_2 auf Grund einer Reduzierung des Laktosetransports führt dazu, daß nicht - wie beim Wildtyp - Milchsäure das einzige Enzymprodukt ist.

Eine solche Rückkopplung könnte auch das Säurespektrum bei den Mutanten der Klasse II so zugunsten von Ameisensäure und Essigsäure verändern, daß die Indikatorplatten keine oder nur sehr geringe Säurebildung anzeigen. Dies ist umso leichter möglich, da es sich um ungepufferte Platten von einem p_H = 6,8 handelt. Entstehende Ameisensäure und Essigsäure können sich bei einer Inkubationstemperatur

von 37° C leicht verflüchtigen. Leider konnten Ameisensäure und Essigsäure durch das angewandte dünnschichtchromatographische Verfahren nicht erfaßt werden, da sie sich verflüchtigten.

Eine Bestätigung dieser Theorie könnte mit der Anwendung der gaschromatographischen Analytik von Dallmeier[4] und Stegmeier[112] erbracht werden. Dieses Verfahren gestattet es, quantitative Bestimmungen des Säurespektrums durchzuführen.

Eine wertvolle Hilfe für die weitere Charakterisierung der Defekte im PTS dürften die im Kapitel 1.4.5. beschriebenen Komplementationstests der einzelnen Komponenten bieten.

Die isolierten Mutanten sind auch dazu geeignet, wesentliche Zusammenhänge zwischen Säurebildung und Polysaccharidsynthese bei der Entstehung der Karies aufzuklären. Für Experimente mit gnotobiotischen Tieren stehen zur Verfügung:

1) Mutanten, die mit keinem der angebotenen Substrate Säuren bilden können, die aber eine große Menge an Polysaccharid aus Saccharose produzieren.

2) Mutanten, die Glukose zu Säuren abbauen, aber mit Saccharose weder wachsen noch Polysaccharid bilden können.

Außerdem werden von den Mutanten verschiedene Typen an Polysaccharid aufgebaut. Strukturuntersuchungen an diesen Polysacchariden könnten eine Aufklärung der Biosynthese des Polysaccharids ermöglichen.

6. Zusammenfassung

6.1. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des Zuckermetabolismus

Die Untersuchungen wurden mit kariogenen Stämmen von Strep. mutans durchgeführt, die aus Zahnplaques bei Menschen isoliert worden waren.

Um den intrazellulären Zustand von aufgenommenen Substraten aufklären zu können, wurde eine einfache dünnschichtchromatographische Trennung erarbeitet, bei der besonders die phosphorylierten Zwischenprodukte gut voneinander getrennt werden. Durch die Verwendung von ^{14}C markierten Substraten und die Anwendung der Autoradiographie ist eine sehr niedrige Nachweisgrenze erreicht worden. Der Einsatz von Doppelmarkierungen mit ^{14}C und ^{32}P erlaubte eine Identifizierung von phosphorylierten Intermediären. Um zwischen ^{32}P und ^{14}C unterscheiden zu können, wurde eine Glasplatte von 2 mm Dicke zwischen die Dünnschichtplatte und den Röntgenfilm gelegt. Nur ^{32}P verursacht eine Belichtung des Films, ^{14}C-Strahlung wird absorbiert.

Die DC-Trennung ist gut geeignet, um aufzuklären

a) nach welchem Stoffwechselweg Zucker abgebaut werden,

b) an welchem Enzym des Stoffwechsels ein Inhibitor angreift,

c) ob durch einen Inhibitor ein anderer - in ungehemmten Zellen unbedeutender - Abbauweg erzwungen wird und

d) welcher enzymatischer Block bei Mutanten einen Substratabbau verhindert.

6.2. Der Transport und die Phosphorylierung bei den Hexiten Sorbit und Mannit

Um die Fähigkeit zu erlangen, größere Mengen an Hexiten aus dem Medium aufnehmen zu können, war ein mehrstündiges Wachstum in einem Sorbit- oder Mannitmedium notwendig. Auf solche Art induzierte Bakterien nahmen sehr rasch Hexite auf und es setzte sofort ein Abbau ein. Unmittelbar nach der Substratzugabe waren zahlreiche Metaboliten des Embden-Meyerhof-Weges nachweisbar, nach 10-20 Minuten resultierte aus der Aufnahmerate und der Ausscheidung von Endprodukten eine Sättigungskurve.

Alle Hexit-Analoga, die in nennenswertem Maße aufgenommen werden konnten, sind im Cytoplasma als die entsprechenden Phosphate identifiziert worden. Die am besten geeigneten Cofaktoren für die Phosphorylierungsreaktion bei Zellen, deren Membran durch Toluol aufgelöst wurde, waren Phosphoenolpyruvat und seine Vorstufe, die 2-Phosphoglycerinsäure. Auch die Gegenwart von 10^{-2}m NaF störte die Phosphatbildung nicht, wenn PEP als Cofaktor zugesetzt wurde. Ohne Zusatz dieser Cofaktoren oder in Gegenwart von ATP oder von Glukose- und Fruktosemonophosphaten

waren nur mit Sorbit als Substrat geringe Phosphatbildungen meßbar, nicht jedoch mit Mannit. 10^{-2}m NaF als einziger Zusatz verursachte einen totalen Block der Phosphatbildung.

Dies sind Kriterien des PEP-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-Systems, bei dem die Aufnahme des Substrats mit der Phosphorylierung gekoppelt ist. Dieses Transportsystem wurde bei einer Reihe von Bakterien gefunden und besteht aus zwei nicht stereospezifischen und einer oder zwei für den Zucker stereospezifischen Proteinkomponenten. Eine dieser Komponenten muß als membrangebunden angenommen werden, denn im "Rohextrakt" konnte keine PEP-abhängige Phosphotransferase-Aktivität festgestellt werden.

Für den Sorbit- und Mannittransport sind zwei verschiedene PEP-abhängige Hexit-Phosphotransferasen-Systeme verantwortlich. So beeinflußte ein 100-facher Überschuß an Mannit die Aufnahme von Sorbit kaum, das gleiche gilt umgekehrt. Auch andere Zucker und Polyole zeigten nur geringe Konkurrenz mit den beiden PEP-abhängigen Hexit-Phosphotransferasen.

Um die Aufnahme vom Stoffwechsel unabhängig untersuchen zu können, wurde eine Reihe von nichtfermentierbaren Polyolen ausgewählt, die in ihrer Struktur ähnlich den Hexiten sind. Mit den Hexiten vergleichbare Ergebnisse lieferte nur 2-Desoxy-D-Sorbit (2-Desoxy-D-Mannit). Da aber dieses Molekül gerade am C-2 Atom verändert ist, ist es ungeeignet für eine Differenzierung zwischen dem Sorbit- und Mannittransportsystem. Die anderen Polyole Xylit, Arabit

und 3-O-Methylsorbit wurden nur mit viel geringeren Raten als die Hexite aufgenommen und zeigten nur geringe kompetitive Hemmung der Aufnahme gegenüber den Hexiten. Sie sind also keine echten Konkurrenten und wurden durch die PEP-abhängigen Hexit-Phosphotransferase-Systeme nur in Spuren oder garnicht phosphoryliert. Deshalb sind alle eingesetzten Hexit-Analoga ungeeignet, um diese PEP-abhängigen Hexit-Phosphotransferase-Systeme zu charakterisieren.

Besonders ausführlich wurde der Einfluß der Natriumfluorid-Konzentration von 10^{-1}m bis 10^{-5}m auf die Aufnahme und den Metabolismus der Hexite studiert. Wurde mit hohen NaF-Konzentrationen (10^{-1} bis $5x10^{-2}$m) 15 Minuten vor der Substratzugabe vorinkubiert, so waren die Aufnahmeraten deutlich reduziert und im Cytoplasma reicherte sich hauptsächlich 2-Phosphoglycerinsäure an. Wurde 10^{-2}m NaF 10 Minuten nach der Sorbitzugabe in die Zellsuspension gebracht, so war nach weiteren, 5, 10, 15 oder 20 Minuten eine deutliche Anreicherung von 2-Phosphoglycerinsäure festzustellen, während alle anderen vorher erkennbaren Metaboliten deutlich in den Zellen abgenommen hatten. Bei niederen Fluoridkonzentrationen waren die gleichen Zwischenprodukte wie in den ungehemmten Ansätzen zu erkennen, dabei war wiederum 2-Phosphoglycerinsäure gegenüber den anderen Intermediären in etwas höheren Konzentrationen vorhanden. In allen Fällen wirkte also NaF in intakten Zellen am stärksten auf das Enzym Enolase. Unbedeutend war sein Einfluß auf die Aldolase, obwohl in vitro

im zellfreien Extrakt 10^{-2}m NaF auch die Aldolase vollkommen inhibierte. Die Lokalisierung der beiden Enzyme könnte eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Hemmwirkung sein. Die Enolase ist membrangebunden, die Aldolase ist im Cytoplasma.

6.3. Der Transport und die Phosphorylierung bei den Hexosen und Disacchariden

Für Glukose und Fruktose konnten bei Zellen, die mit Toluol behandelt worden waren, ebenfalls Aktivitäten PEP-abhängiger Phosphotransferase-Systeme nachgewiesen werden. Auch hier waren PEP bzw. 2-Phosphoglycerinsäure diejenigen Phosphat-Donatoren, die die höchste Phosphorylierungsrate erzielten. Galaktose und ß-Thiomethylgalaktosid zeigten keine Aktivität eines solchen Phosphorylierungssystems.

Die Aufnahme von Glukose, α-Methylglukose bzw. Fruktose konnte durch die Gegenwart eines 100-fachen Überschusses eines zweiten Zuckers in keinem Fall deutlich verringert werden. Bei der Aufnahme handelt es sich also um sehr spezifische Enzymreaktionen.

Auch für die nicht abbaufähigen Glukosederivate α-Methylglukose und 3-O-Methylglukose konnte nachgewiesen werden, daß sie nicht geeignet waren, den Glukosetransport zu charakterisieren. Wurden Glukose, Fruktose und Galaktose als Substrat bei Fluoridkonzentrationen von 10^{-2}m eingesetzt, so wurde - wie bei den Hexiten - hauptsächlich 2-Phosphoglycerinsäure angereichert. Bei Zusatz

niederer Fluoridkonzentrationen und ungehemmten Ansätzen konnten die gleichen Zwischenprodukte nachgewiesen werden.

Eines dieser Metaboliten war bei den Substraten Sorbit, Mannit, Glukose, Fruktose, Laktose und Saccharose Fruktose-1,6-diphosphat. Da nur der Embden-Meyerhof-Weg über diese Stufe führt, ist dieser Abbauweg für diese Zucker und Zuckeralkohole sehr wahrscheinlich.

6.4. Erzeugung, Isolierung und Charakterisierung von Stoffwechselmutanten

Es wurde ein Mutageneseverfahren mittels 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin erarbeitet, das es ermöglicht, ohne einen gesonderten Anreicherungsschritt eine große Anzahl von Stoffwechselmutanten zu erzeugen. Diese Methode sollte überall dort zum Erfolg führen, wo durch den Ausfall einer Enzymfunktion das Wachstum der Zelle stark eingeschränkt wird.

Die Mutagenese wurde mit dem Stamm 275 ausgeführt. Es wurden solche Kolonien von Agarplatten, die 1% Zucker oder Zuckeralkohol und Bromkresolpurpur als Indikator enthielten, isoliert, die nach einer fünftägigen Bebrütung der Platten keinen Farbumschlag verursachten. Sie wurden als nicht säurebildend mit dem angebotenen Substrat bezeichnet (z.B. Sorbit$^-$). Diese Kolonien blieben sehr klein und farblos, während säurebildende viel größer wurden und sich zitronengelb färbten.

Einige Mutanten konnten auf bestimmten Agarplatten (Fruktose, Galaktose, Saccharose) überhaupt nicht wachsen. Diese Zucker müssen für diese Mutanten toxisch wirken. Neben dem totalen Unvermögen, angebotenes Substrat abzubauen, wurde bei einer Reihe von Mutanten eine Beeinträchtigung des Stoffwechsels festgestellt, die sich in einem langsamen Wachstum und einer geringen Säurebildung äußerte.

Auf Grund des Phänotyps konnten drei Gruppen von Mutanten mit Mutationen im Sorbit-, Mannit-, Mannose-, Galaktose-, Laktose-, Glukose-, Fruktose- oder Saccharose-Abbau angenommen werden. Es sind die Stoffwechselmutanten mit Einzelmutationen, mit Mehrfachmutationen und eine kleine Gruppe von Mutanten, die keinen der getesteten Zucker fermentieren können.

Mutanten, die unfähig sind, Sorbit abzubauen, konnten in großer Zahl erzeugt werden. Alle diese Mutanten fermentieren jedoch Mannit wie der Wildtyp. Andererseits konnte eine Mannit$^-$-Mutante isoliert werden, die Sorbit zu Säuren abbauen kann. Damit wurde ein weiterer Beweis für den voneinander unabhängigen Metabolismus von Sorbit und Mannit erbracht.

Da Sorbit-Mutanten von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit waren, wurden sie ausführlich charakterisiert.

Um Aussagen über den Grund des Unvermögens, angebotenes Substrat bis zu Säuren abzubauen, machen zu können, wurde versucht aufzuklären, wo der Stoffwechsel geblockt bzw. ob bereits die Aufnahme der Substrate behindert war. Bei jeder Mutante wurde deshalb untersucht:

a) Das Säurebildungsvermögen,

b) die Aufnahmerate,

c) der intrazelluläre Zustand des aufgenommenen Sorbits,

d) die Aktivität des PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase-Systems,

e) die Aktivität der Sorbit-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Die Ergebnisse dieser Tests erlaubten die Einteilung der mit Sorbit keine Säure bildenden Mutanten in zwei Klassen. Eine wertvolle Ergänzung zur Charakterisierung der durch Mutagenese erzeugten Mutanten bildeten die Untersuchungen dreier Stämme (290, 407 und 431) von Strep. mutans, die ebenso wie der Wildtyp Stamm 275 von Gehring aus den Plaques kariesanfälliger Personen isoliert worden waren und die - mit Ausnahme des Unvermögens aus Sorbit Säuren zu bilden - in allen Stoffwechselleistungen und serologischen Befunden mit dem Stamm 275 (Wildtyp) identisch waren.

Die Mutanten der Klasse I besitzen keine Aktivität des PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase-Systems und eine Aktivität der Sorbit-6-Phosphat-Dehydrogenase ist nicht zweifelsfrei nachzuweisen. Intrazellulär findet sich nach einer 30-minutigen Inkubationszeit nur Sorbit-6-Phosphat und eine geringe Menge an unverändertem Substrat. Der Stamm 431 stimmt in allen Kriterien mit den Mutanten dieser Klasse überein und kann daher dieser Klasse zugeordnet werden.

Ein fehlendes spezifisches Transportsystem und eine zumindest weitgehend inaktive Sorbit-6-P-DH sind die

Ursachen für das Unvermögen dieser Mutanten, Sorbit zu Säuren abzubauen. Da beide Defekte immer gleichzeitig auftreten, müssen die beiden Enzyme sehr eng miteinander gekoppelt sein. Ob der Ausfall durch eine Mutation in den Genen oder durch den Verlust der Induktionsfähigkeit, bedingt durch eine Mutation im Regulationssystem, verursacht wird, kann nur durch genetische Arbeiten geklärt werden. Spontane Revertanten der Klasse I hatten fast die gleichen Aktivitäten wie der Wildtyp.

In der Klasse II wurden die Mutanten zusammengefaßt, die Sorbit nicht oder nur zu sehr geringen Mengen an Säuren abbauen konnten (Sorbit^{-}- und Sorbit$^{(-)}$-Mutanten) und bei denen intrazellulär alle Metaboliten des Wildtyps nachweisbar waren. Dieser Klasse war außerdem gemeinsam:

a) Alle Mutanten bildeten auf Agarplatten relativ kleine und farblose Kolonien;

b) eine - wenn auch gegenüber dem Wildtyp - reduzierte Aktivität des PEP-abhängigen Sorbit-Phosphotransferase-Systems;

c) eine Aktivität der Sorbit-6-P-DH, die mit der des Stamms 275 vergleichbar;

d) sehr häufig wurden spontane Revertanten festgestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen bei den Stämmen 290 und 407 waren mit den oben beschriebenen Gemeinsamkeiten der Klasse II identisch, außer, daß die Mutationen sehr stabil waren. Diese Stämme konnten daher dieser Klasse zugeordnet werden.

Da den Mutanten auf den Indikatorplatten ein reichliches Sorbitangebot zur Verfügung stand und eine - wenn auch reduzierte - Aufnahmefähigkeit für Sorbit nachgewiesen werden konnte, muß auf Grund der kleinen Kolonienform und der geringen Menge an ausgeschiedenen Säuren auf einen sehr langsamen Abbau des Sorbits geschlossen werden. Welcher Enzymdefekt diesen verminderten Abbau verursacht, konnte noch nicht festgestellt werden. Möglich wäre als Ursache eine durch die Regulation des Stoffwechsels bedingte Aktivitätsänderung analog wie sie bei Strep. lactis beobachtet wurde. Durch die intrazelluläre Konzentration des Fruktose-1,6-diphosphats wird bei Strep. lactis das letzte Enzym des Stoffwechsels, die Laktat-Dehydrogenase, reguliert. Mutanten, die auf Grund eines Transportdefekts wenig Laktose aufnehmen können, erreichen nur geringe Konzentration an F-1,6-P_2. Dies verursacht, daß Pyruvat nicht zu Laktat hydriert, sondern zu Formiat und Acetat gespalten wird.

Literaturverzeichnis

1) F.J. Orland, J.R. Blayney, R.W. Harrison, J.A. Reyniers, P.C. Trexler, M. Wagner, H.A. Gordon und T.D. Luckey, J.dent. Res. 33, 147 (1954)

2) F.J. Orland, J.R. Blayney, R.W. Harrison, J.A. Reyniers, P.C. Trexler, R.F. Ervin, H.A. Gordon und M. Wagner, J.Am. dent. Ass. 50, 259 (1955)

3) K.G. König, Karies und Kariesprophylaxe, 1. Auflage, W. Goldmann-Verlag München, 1971 S. 23

4) E. Dallmeier, Dissertation, Erlangen 1970

5) E. Dallmeier, H.J. Bestmann und A. Kröncke, Dtsch. zahnärztl. Z. 25, 887 (1970)

6) G.W. Burnett und H.W. Sherp, Oral microbiology and infections diesease, 3. Auflage, The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1968)

7) J. Carlsson, Odont. Revy 16, 348 (1965)

8) F. Gehring, Extrazelluläre Polysaccharide bildende Streptokokken aus Zahnplaques und ihre Beziehung zur Zahnkaries, Carl Hauser Verlag, München, 1972

9) H.R. Kaback, Ann. Rev. Biochem. 39, 561 (1970)

10) G.N. Cohen und J. Monod, Bacteriol. Rev. 21, 169 (1957)

11) A. Kepes und G.N. Cohen in J.C. Gunsalus und R.Y. Stanier: The Bacteria, Vol. V, Academic Press New York, 1962, S. 179

12) F. Jacob und J. Monod, J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)

13) G.A. Scarborough, N.K. Rumley und E.P. Kennedy, Proc. N.A.S. 60, 951 (1968)

14) E. Pavlasova und F.M. Harold, J. Bacteriol. 98, 198 (1969)

15) C.F. Fox und E.P. Kennedy, Proc. N.A.S. 54, 981 (1965)

16) E.M. Barnes, Jr. und H.R. Kaback, Proc. N.A.S. 66 , 1190 (1970)

17) H.R. Kaback, Biochim. Biophys. Acta 265, 367 (1972)

18) H. Winkler und T.H. Wilson, J. Biol. Chem. 241, 2200 (1966)

19) E. Pavlasova und F.M. Harold, J. Bacteriol. 98, 198 (1969)

20) H.R. Kaback und E.M. Barnes, Jr., J. Biol. Chem. 246, 5523 (1971)

21) W. Kundig. S. Gosh und S. Roseman, Proc. N.A.S. 52, 1067 (1964)

22) E.C.C. Lin, Ann. Rev. Genetics(1970)225

23) R.D. Simoni, M.F. Smith und S. Roseman, Biochem. Biophys. Res. Commun.31, 804 (1968)

24) W. Kundig, F.D. Kundig, B.E. Anderson und S. Roseman, J. Biol. Chem. 241, 3243 (1966)

25) S. Roseman, J. Gen. Physiol. 54 , 138 (1969)

26) A.H. Romano, S.J. Eberhard, S.L. Dingle und F.D. McDowell, J. Bacteriol. 104, 808 (1970)

27) S. Tanaka, D.G. Fraenkel und E.C.C. Lin, Biochem. Biophys. Res. Commun 27, 63 (1967)

28) S. Tanaka und E.C.C. Lin, Proc. N.A.S. 57, 913 (1967)

29) R.D. Simoni, M. Levinthal, F.D. Kundig, W. Kundig, B.E. Anderson, P.E. Hartmann und S. Roseman, Proc. N.A.S. 58, 1963 (1967)

30) J.B. Egan und M.L. Morse, Biochim. Biophys. Acta 97, 310 (1965)

31) B. Anderson, N. Weigel, W. Kundig und S. Roseman, J. Biol. Chem. 246, 7023 (1971)

32) W. Kundig und S. Roseman, J. Biol. Chem. 246, 1407 (1971)

33) W. Kundig und S. Roseman, J. Biol. Chem. 246, 1393 (1971)

34) L. Rothfield und A. Finkelstein, Ann. Rev. Biochem. 37, 463 (1968)

35) D.G. Fraenkel, J. Biol. Chem. 243, 6451 (1968)

36) V. Sapico, T.E. Hanson, R.N. Walter und R.L. Anderson, J. Bacteriol. 96, 51 (1968)

37) T.E. Hanson und R.L. Anderson, Proc.N.A.S. 61, 269 (1968)

38) E.H. Creaser, J. Gen. Microbiol. 12, 288 (1955)

39) J.K. McClatchey und E.D. Rosenblum, J. Bacteriol. 86, 1211 (1963)

40) W. Hengstenberg, J.B. Egan und M.L. Morse, Proc. N.A.S. 58, 274 (1967)

41) R.D. Simoni, J.B. Hays, T. Nakazawa und S. Roseman, J. Biol. Chem. 248, 957 (1973)

42) J.B. Hays, R.D. Simoni und S. Roseman, J. Biol. Chem. 248, 941 (1973)

43) M.L. Morse, K.L. Hill, J.B. Egan und W. Hengstenberg, J. Bacteriol. 95, 2270 (1968)

44) W. Hengstenberg, W.K. Penberthy, K.L. Hill und M.L. Morse, J. Bacteriol. 99, 383 (1969)

45) R.D. Simoni und S. Roseman, J. Biol. Chem. 248, 966 (1973)

46) D. Berkowitz, J. Bacteriol. 105, 232 (1971)

47) M. Liss, S.B. Horwitz und N.O. Kaplan, J. Biol. Chem. 237,1342 (1962)

48) E.C.C. Lin, J. Biol. Chem. 236, 31 (1961)

49) S. Tanaka, S.A. Lerner und E.C.C. Lin, J. Bacteriol. 93, 642 (1967)

50) N.J. Patni und J.K. Alexander, J. Bacteriol. 105, 226 (1971)

51) N.E. Kelker und R.L. Anderson, J. Bacteriol. 105, 160 (1971)

52) J. Lengeler und E.C.C. Lin, J. Bacteriol. 112, 840 (1972)

53) R.D. Simoni, T. Nakazawa, J.B. Hays und S. Roseman, J. Biol. Chem. 248, 932 (1973)

54) W. Kundig und S. Roseman in W.A. Wood: Methods in Enzymology, Vol. IX, Academic Press New York - London 1966, S. 396

55) L. McKay, A. Miller III, W.E. Sandine und P.R. Elliker, J. Bacteriol. 102, 804 (1970)

56) J.C. Cordaro und S. Roseman, J. Bacteriol. 112, 17 (1972)

57) W. Epstein, S. Jewett und S.F. Fox, J. Bacteriol. 104, 793 (1970)

58) M.H. Peterson, W.C. Friedland, F.W. Dewison Jr. und J.C. Sylvester, Appl. Microbiol. 4, 316 (1956)

59) L. Marcus und A.G. Marr, J. Bacteriol. 82, 224 (1961)

60) P.V. Phibbs Jr. und R.G. Eagon, Arch. Biochem. Biophys. 138, 470 (1970)

61) S.B. Horwitz und N.O. Kaplan, J. Biol. Chem. 239, 830 (1964)

62) S. Sakai und K. Yamanaka, Biochim. Biophys. Acta 151, 686 (1968)

63) G.M. De Drets und A. Arias, J. Bacteriol. 103, 97 (1970)

64) B.M. Scher und B.L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys. 116, 117 (1966)

65) H.G. Hers, Biochim. Biophys. Acta 37, 120 (1960)

66) J.T. Cummius, T.E. King und V.H. Cheldelin, J. Biol. Chem. 224, 323 (1957)

67) K. Sato et al., Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 31, 877 (1967)

68) K. Kersters und J. De. Ley in S.P. Colowick und N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Vol. IX, Academic Press New York 1966, S. 170

69) H. Okazaki, T. Kanzaki, M. Doi, K. Nara und K. Motiauki, Agr. Biol. Chem. 32, 1250 (1968)

70) A. Sols und R.K. Crane, J. Biol. Chem. 210, 581 (1954)

71 D.M. Kipnis und C.F. Cori, J. Biol. Chem. 234, 171 (1959)

72) A. Sols, G. de la Fuente, C. Villar-Palasi und C. Asensio, Biochim. Biophys. Acta 30, 92 (1958)

73) F. Alvarado, Biochim. Biophys. Acta 41, 233 (1960)

74) W. Hengstenberg, J.B. Egan und M.L. Morse, J. Biol. Chem. 243, 1881 (1968)

75) A.J. Smalley, P. Jahrling und P.J. Van Demark, J. Bacteriol. 96, 1595 (1968)

76) J.E. Citti, W.E. Sandine und P.R. Elliker, J. Bacteriol. 89, 937 (1965)

77) E.R. Kashket und T.H. Wilson, J. Bacteriol. 109, 784 (1972)

78) J.A. Kanapka und J.R. Hamilton, Arch. Biochem. Biophys. 146, 167 (1971)

79) G. Buttin, J. Mol. Biol. 7, 164 (1963)

80) H.C. Douglas und D.C. Harothorm, Genetics 49, 837 (1964)

81) G.H. Luginbuhl und H. Gooder, J. Bacteriol. 109, 512 (1972)

82) P. Jensen, C. Parkes und D. Berkowitz, J. Bacteriol. 111, 351 (1972)

83) T. Fukassawa und H. Nikaido, Biochim. Biophys. Acta 48, 470 (1961)

84) N.R. Cozarelli, J.P. Kock, S. Hayashi und E.C.C. Lin, J. Bacteriol. 90, 1325 (1965)

85) E. Englesberg, R.L. Anderson, R. Weinberg, N. Lee, P. Hoffee, G. Huttenhaue und H. Boyer, J. Bacteriol. 84, 137 (1962)

86) D.G. Fraenkel, J. Biol. Chem. 243, 6451 (1968)

87) K. Lohmann und O. Meyerhof, Biochem. Z. 273, 60 (1934)

88) O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. 310, 384 (1942)

89) E.J. Hewitt und D.J.D. Nicholas in R.M. Hochster und J.H. Quastel: Metabolic Inhibitors, Vol. I, Academic Press New York (1963, S. 401

90) loc. cit. 89) S. 311

91) J. Runnstrom, Naturwissenschaften 29, 690 (1941)

92) E. Aubel, A.J. Rosenberg und J. Szulmajster, Biochim. Biophys. Acta 5, 515 (1950)

93) H.R. Kaback, J. Biol. Chem. 243, 3711 (1968)

94) J.R. Hamilton, Can. J. Microbiol. 15, 1013 (1969)

95) M.L. Wolfrom und A. Thompson in R.L. Whistler und M.L. Wolfrom: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II, Academic Press New York - London 1963, S. 67

96) W. Fischer, persönl. Mitteilung

97) W. Fischer, Habilitationsschrift, Erlangen 1967 S. 94

98) H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, 1. Auflage, Verlag Chemie 1962

99) E.A. Newsholme, J. Robinson und K. Taylor, Biochim. Biophys. Acta 132, 338 (1967)

100) loc. cit. 4) S. 302

101) J. Mechery, persönl. Mitteilung

102) P.J. van Denmark und P. Plackett, J. Bacteriol. 11, 454 (1972)

103) J.B. Egan und M.L. Morse, Biochim. Biophys. Acta 97, 310 (1965)

104) loc. cit. 8) S. 22

105) loc. cit. 4) S. 254

106) K.K. Mäkinen, persönl. Mitteilung

107) E. Cerdá-Olmedo und P.C. Hanawalt, Biochim. Biophys. Acta 142, 450 (1967)

108) E. Cerdá-Olmedo und P.C. Hanawalt, Molec. Gen. Genetics 101, 191 (1968)

109) F. Gehring, persönl. Mitteilung

110) J. Carlsson, Archs. oral. Biol. 17, 1327 (1972)

111) G.M. Demko, S.J.B. Blanton und R.E. Benoit, J. Bacteriol. 112, 1335 (1972)

112) K. Stegmeier, Diplomarbeit, Erlangen 1970

Lebenslauf

Karlheinz S t e g m e i e r

Geboren:	15.4.1943 in Weißenburg/Bay.
Eltern:	Heinrich Stegmeier, Schweißer und Frieda Stegmeier, geb. Müller
Volksschule:	1949 - 1954 Röttenbach, Krs. Roth
Oberrealschule:	1954 - 1956 Oberrealschule Weißenburg
	1956 - 1963 Dürer-Oberrealschule Nürnberg
Wehrdienst:	1963 - 1965
Studienbeginn:	Wintersemester 1965/66 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Diplomchemiker-Vorprüfung :	Februar 1968
Diplomchemiker-Hauptprüfung :	Dezember 1969
Diplomarbeit:	Januar 1970 - September 1970 bei Prof. Dr. H.J. Bestmann
Dissertation:	Oktober 1970 - August 1973 bei Prof. Dr. H.J. Bestmann

Offsetdruck-Fotodruck
J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990